OPS

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

09-44621

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** AGENTE PARA PREVENIR/TRATAR EL CANCER

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

DOMICILIO OSAKA, JAPON

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

72. **BOGOTÁ, D. C.,** _____

99/

ORMA P-10)

98124 -Imprenta Nacional de Colombia - 2007

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-044621- -00000-0000
Fecha: 2009-05-04 17:02:03 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 844

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón.

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome,
Chuo-ku, Osaka-shi,
Osaka 5410045,
Japón

Domicilio: Osaka,
Japón

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número ____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. Shuji, SATO
c/o Takeda San Francisco, Inc.
285 East Grand Ave.,
South San Francisco,
California 94080-4804,
Estados Unidos de América

2. Tsutomu OSHIMA
c/o Takeda San Francisco, Inc.
285 East Grand Ave.,
South San Francisco,
California 94080-4804,
Estados Unidos de América

3. Tomofumi KUROKAWA
c/o Takeda San Francisco, Inc.
285 East Grand Ave.,
South San Francisco,
California 94080-4804,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2007/069908 Fecha: 4 de octubre de 2007
Publicación Internacional No. WO 2008/044754 A1 Fecha: 17 de abril de 2008

6 Título (54)

AGENTE PARA PREVENIR/TRATAR EL CÁNCER

7 Clasificación Internacional (51) C07K 016/032

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

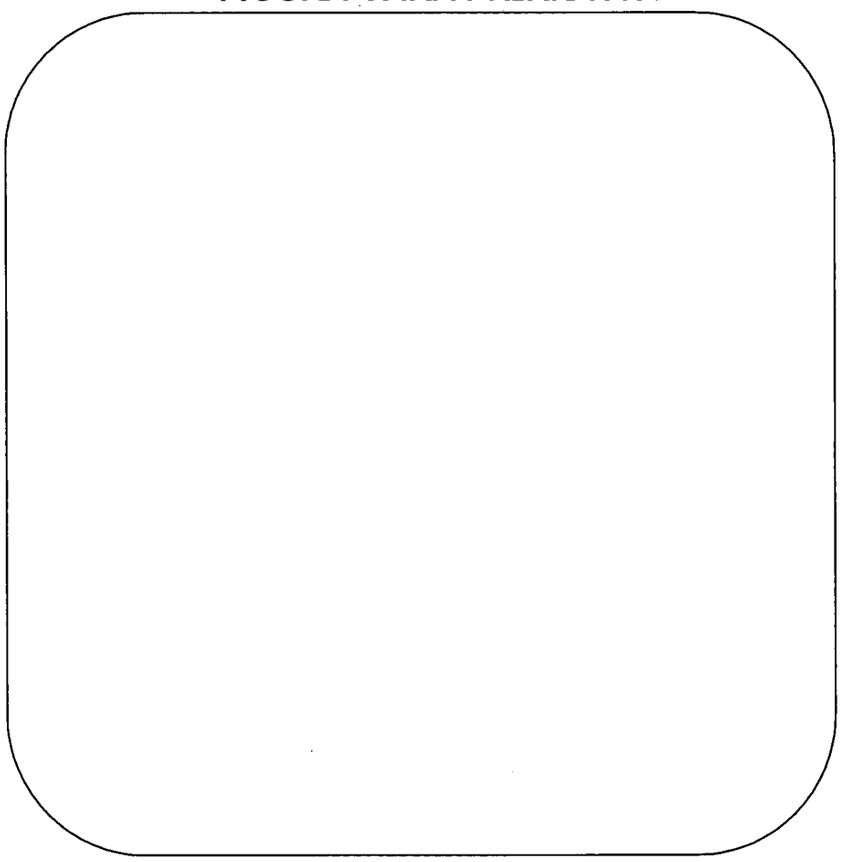
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
JP	6 de octubre de 2006	PCT/JP2006/320429
AR	4 de abril de 2007	P-070101453
JP	6 de abril de 2007	2007-100876

(9) **Comprobante de pago No.:** 09-29,809 **Fecha:** 20 de abril de 2009
Comprobante de pago No.: 09-24,827 **Fecha:** 30 de marzo de 2009

(10) **Anexos:**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 540.000.oo.
- [x] Comprobante de pago por 32 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por $800.000.oo.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [x] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/044754 A1
   Descripción:
   Páginas 195 en el idioma original
   Páginas 299 en español
   Reivindicaciones: Número (s) 47
   Figuras: Número (s) 4

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias

4. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de dirección de los inventores **Shuji, SATO, Tomofumi KUROKAWA y Tsutomu OSHIMA**

3. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

5

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, D.C. - COLOMBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

14656
08085

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
domiciliado (s) en/of 1-1, Doshomachi 4-chome,
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka Japan

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso_administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso_administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, I (we) grant to the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, exercising or not jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

promueven. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 14th day of December, 2004

en/in Osaka, Japan

por/by

Firma Hiroshi Akimoto Ph. D. Signature
Executive Director
Member of the Board, General Manager,
Intellectual Property Dept.
Authorized Signing Officer

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

7

REGISTER NUMBER 334 / 2004

I hereby certify that this document was signed before me and that the signature appearing on the same is the true signature of Hiroshi Akimoto, Ph. D., Executive Director, Member of the Board, General Manager, Intellectual Property Department of Takeda Pharmaceutical Company Limited.

Dated this 14th day of December, 2004

10-8, Edobori 1-chome,
Nishi-ku, Osaka, Japan.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Kiyoomi Fujita

Kiyoomi Fujita
Notary attached
to The Osaka Legal
Affairs Bureau

8

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

   This public document

2. has been signed by Kiyoomi FUJITA

3. acting in the capacity of Notary Public of the Osaka Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of Kiyoomi FUJITA, Notary Public

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Certified

5. at **Osaka**

6. DEC. 17. 2004

7. by **the Ministry of Foreign Affairs**

8. No. 04149

9. Seal/stamp:

10. Signature:

Tsutomu HIGUCHI

For the Minister for Foreign Affairs

9

大阪法務局所属　公証人役場

認証登簿　平成１６年 第　334　号

嘱託人 武田薬品工業株式会社 常務取締役　知的財産部長 秋元浩は、本職の面前でこの証書に署名した。

よって、その署名が本人の自筆であることを証する。

平成　16　年　12　月

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

大阪市西区江戸堀１丁目１０番８号（帝人ビル内）

公証人　**藤田清臣**　役場において

大阪法務局所属

公証人　藤田清臣

10

THE OSAKA CHAMBER OF COMMERCE & INDUSTRY

2-8 HOMMACHIBASHI, CHUO-KU, OSAKA 540-0029, JAPAN.
FAX : (06)6944-6248 TEL : (06)6944-~~6412~~ 6411
URL : http://www.osaka.cci.or.jp/

November 17, 2004

To whom it may concern:

CERTIFICATE OF MEMBERSHIP

This is to certify that the undermentioned company is registered as a member of this Chamber.

Company name: Takeda Pharmaceutical Company Limited

(The former company name in English was Takeda Chemical Industries, Ltd. until June 29, 2004.)

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka, Japan

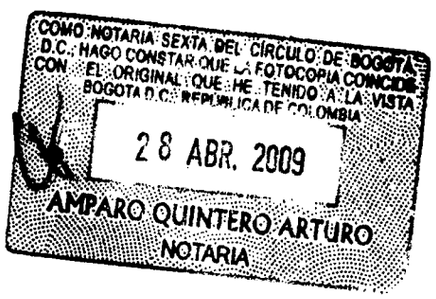
Membership Number: KT-01-00080

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

The Osaka Chamber of Commerce & Industry

Yoshinobu Kobayashi
Authorized Signatory

A [illegible]149



EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, DICIEMBRE 20, 2004
No. 299

El encargado de las funciones consulares de Colombia
CERTIFICA:

Que el (la) Señor(a) YOSHINOBU KOBAYASHI, quien autoriza el presente documento , es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) CAMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA, OSAKA y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Firma del Encargado de Funciones Consulares

Derechos: US$23.oo

RAFAEL RICARDO OROZCO
Segundo Secretario

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 FEB -4 A 2:33

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

085749

PARA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

DE RELACIONES
ERIORES

11

総第 3603 号

証　　明

大阪法務局所属公証人　**藤田清臣**

平成 16年12 月14 日付

平成16年 登簿 第 334 号

この認証の付与は，在職中の公証人がその権限に基づいてしたものであり，かつ，その押印は，真実のものであることを証明する。

平成16年12月17日
平成　　年　　月

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTUNDUAGA
NOTARIA

大阪法務局長　**梅津和宏**

CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has been executed by Notary,duly authorized and practising in Osaka, Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date 04.12.17

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 02.04/05b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento por medio del cual **TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMIMTED** domiciliado en el 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, Japón, otorga derechos de Representación y Poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555; y GERMÁN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 14 de diciembre de 2004 en Osaka, Japón.

Firma Ilegible

Firma Hiroshi Akimoto Ph. D.
Director Ejecutivo
Miembro de la Junta, Gerente
Departamento de Propiedad Intelectual
Signatario Autorizado

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., PUDO CONSTATAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

REGISTRO NÚMERO **334** / 2004

Por el presente certifico que este documento fue firmado ante mí y que la firma que aparece en el mismo es la firma auténtica de Hiroshi Akimoto, Ph. D., Director Ejecutivo, Miembro de la Junta, Gerente General, Departamento de Propiedad Intelectual de Takeda Pharmaceutical Company Limited.

Expedido hoy 14 de diciembre de 2004

10-8, Edobori 1-chome

Nishi-ku, Osaka, Japón

Firma ilegible

Kiyoomi Fujita
Notario adjunto a la
Oficina de Asuntos Legales de Osaka

DOCUMENTO ANTERIOR EN JAPONÉS

(Anexo)

Texto en Japonés

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo ha sido suscrito por un notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón, y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 04.12.17

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: **JAPÓN**
   Este documento público
2. ha sido firmado por Kiyoomi FUJITA
3. actuando en calidad de Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
4. lleva el sello/estampilla de Kiyoomi FUJITA, Notario Público

14

La Cámara de Comercio e Industria de Osaka

Firma Ilegible

Yoshinobu Kobayashi

Signatario Autorizado

(Respaldo)

Certificado No. 299 del 20 de diciembre de 2004 expedido por la EMBAJADA DE COLOMBIA en Tokio, Japón, en donde se certifica que YOSHINOBU KOBAYASHI está legalmente facultado para firmar a nombre de la Cámara de Comercio e Industria de Osaka y que su firma en el anterior documento es auténtica.

Firmado por RAFAEL RICARDO OROZCO, Segundo Secretario.

Pagados los derechos consulares.

Legalización de la firma anterior con el **No. 085749** expedida por el Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores en Santafe de Bogotá el 4 de febrero de 2005

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Es traducción fiel y completa de la copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-6472/WPCL002G/COLO 14656-845-001-0

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Diego Cepeda

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 08 FEB 2005

CODEX JURIS CIVILES

REPUBLICA DE COLOMBIA
Notario Sexto
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 FEB -8 P 2:40

JEFE DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

313395

Diego Cepeda

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

28 ABR. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

15

Certificado

5. en **Osaka** 6. DIC 17 DE 2004

7. por el **Ministerio de Relaciones Exteriores**

8. **No. 04149**

DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

9. **Sello/estampilla** 10. **Firma:**

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES • JAPÓN •

Firma Ilegible

Tsutomu HIGUCHI

Por el Ministro de Relaciones Exteriores

LA CÁMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA DE OSAKA
2-8 HOMMACHIBASHI, CHUO-KU, OSAKA 540-0029, JAPÓN
FAX: (06) 6944-6248 TEL: 6944-~~5412~~ 6411
URL: http://www.osaka.cci.or.jp/

Noviembre 17 de 2004

A quién pueda interesar:

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

CERTIFICADO DE MEMBRESÍA

El presente es para certificar que la siguiente compañía está registrada como miembro de esta Cámara.

Nombre de la compañía: Takeda Pharmaceutical Company Limited

(El nombre anterior de la compañía en inglés fue Takeda Chemical Industries, Ltd. hasta el 29 de junio de 2004.)

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka, Japón

Número de Membresía: KT-01-00080

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Diego Fernando
Ortiz
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 08 FEB 2005
CODEX JURIS CIVILIS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
28 ABR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
3133941
DIEGO Varon
CRUZ FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2005 FEB -8 P 2:39
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2008 年4 月17 日 (17.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/044754 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/32 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/02* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/069908

(22) 国際出願日: 2007 年10 月4 日 (04.10.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
PCT/JP2006/320429
2006 年10 月6 日 (06.10.2006) JP
P-070101453 2007 年4 月4 日 (04.04.2007) AR
特願2007-100876 2007 年4 月6 日 (06.04.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]: 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤秀司 (SATO, Shuji) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目１７番８５号武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 大島勉 (OSHIMA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目１７番８５号武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 黒川智文 (KUROKAWA, Tomofumi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目１７番８５号武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) **Title:** PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC AGENT FOR CANCER

(54) **発明の名称:** 癌の予防・治療剤

(57) **Abstract:** Disclosed is a human monoclonal antibody directed against a protein having an amino acid sequence that is the same as or substantially the same as the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1 or 3, a partial peptide of the protein, or a salt of the protein. The human monoclonal antibody is useful as a prophylactic or therapeutic agent for cancer, a cancer cell apoptosis promoter, a cancer cell proliferation inhibitor, a cytotoxic agent for a cancer cell which utilizes a biodefense mechanism via a Fc region of an antibody, or the like.

(57) 要約: 配列番号：１または配列番号：３で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩に対するヒトモノクローナル抗体は、癌などの予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤、抗体のFc領域を介した生体防御機構を利用する癌細胞障害剤などとして有用である。

WO 2008/044754 A1

DESCRIPTION

AGENT FOR PREVENTING/TREATING CANCER

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a monoclonal antibody against nectin-2 and use thereof, and more particularly, to an agent for preventing/treating cancer or a diagnostic agent for cancer, an apoptosis inducer of cancer cells, a growth inhibitor of cancer cells, and a cytotoxic agent against cancer cells through a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody.

FIELD OF THE INVENTION

It is reported that in cancer its pathological conditions could be assessed by a gene microarray profiling data. Actually in leukemia, it is reported that leukemia can be classified by gene expression profiles. Also it is considered possible to predict response to a particular cancer therapy or discover a novel drug target protein for a particular cancer by clarifying the gene expression profile of each cancerous tissue and accumulating its classification.. Specifically, where an enhanced expression of a certain protein is observed in a certain cancer, it becomes possible to induce an anti-tumor activity in patients newly diagnosed to be the antigen-positive, by means of (i) reducing the expression level of the protein, (ii) suppressing the function of the protein, (iii) eliciting immune response of a host to the protein, etc. At the same time, patients diagnosed to be the antigen-negative can immediately switch over to another cancer therapy, assuming to eliminate any concern of imposing a superfluous burden on patients. As such, it is expected that the expression profile analysis would greatly contribute to molecular diagnosis of a cancer and development of molecular target-based therapeutic drugs.

The nectin-2α gene (RefSeq Accession No. NM_002856) and the nectin-2δ gene (EMBL Accession No. X80038) are genes cloned from human leukemia cell line TF-1-derived cDNA and encode proteins consisting of 479 amino acids and 538 amino acids, respectively (RefSeq Accession No. NP_002847 and EMBL Accession No. CAA56342). The nectin-2δ gene is a splicing variant of the nectin-2α gene and the protein encoded by the nectin-2δ gene has an amino acid sequence corresponding to the 1st to 350th amino acid sequence of a protein encoded by the nectin-2α gene but is different in the amino acid sequence located on and after the 351st amino acid

at the C-terminal portion. In addition, mouse genes (GenBank Accession No. BC009088 and RefSeq Accession No. NM_008990) showing homology to the nectin-2α gene and the nectin-2δ gene are cloned from a library derived from mouse ES cells, and encode proteins consisting of 467 amino acids and 530 amino acids, respectively (GenBank Accession No. AAH09088 and RefSeq Accession No. NP_033016). These mouse nectin-2 genes have homology of about 72% and about 72% in terms of base sequence and about 69% and about 73% in terms of amino acid sequence, to the human nectin-2α gene and nectin-2δ gene, respectively. Nectin-2α and nectin-2δ (hereinafter sometimes collectively referred to as nectin-2) are protein molecules also called PVRL2, PRR2, PVRR2, HveB, CD112, etc. and belong to the nectin family consisting of four members, nectin-1, nectin-2, nectin-3 and nectin-4(hereinafter sometimes collectively referred to as nectin). Andnectin Necl-1, Necl-2, Necl-3, Necl-4 and Necl-5 are known as membrane proteins having a nectin-like structurenectin (J. Biol. Chem. (2004), 279 (17), p18015-p18025).

Nectin belongs to the immunoglobulin superfamily and is single transmembrane glycoprotein having 3 immunoglobulin-like loops in the extracellular region. It is considered that nectin molecules would form cis-dimers on the cell membranes, and the cis-dimers on the cell membranes trans-interact with one another to regulate cell-cell adhesion between epithelial cells or between spermatids and Sertoli cells in a Ca^{2+} concentration-independent mode (Protein, Nucleic Acid and Enzyme (2003), 48 (2), p105-p112; Curr. Biol. (2002), 12, p1145-p1150). It is also reported that nectin-1 and nectin-3 play a part in the formation of synapses via trans-binding (J. Cell Biol. (2002), 156, p555-p565). It is known that the trans-binding of nectins is formed homophilically between the same molecules, whereas heterophilic trans-binding is also formed between nectin-1 and nectin-3, nectin-1 and nectin-4, nectin-2 and nectin-3 as well as nectin-3 and Necl-5 (J. Biol. Chem. (2002), 277 (30), p27006-p27013). It is also known that nectin in the intracellular C-terminal region binds to afadin and connects to the actin cytoskeleton through the molecule (J. Cell Sci. (2003), 116 (1), p17-p27).

As a physiological function of nectins other than cell adhesion, it is reported that for example, nectin-1 acts as a receptor for glycoprotein D expressed on herpes viruses to function as a scaffold of herpes viral entry into cells (J. Cell Sci. (2003), 116 (1), p17-p27). Also, nectin-2 is one of ligands for DNAM-1 (CD226) expressed on natural killer cells and natural killer cells expressing DNAM-1 are considered to induce cytotoxicity upon engagement with nectin-2 expressed on target

cells (J. Exp. Med. (2003), 198 (4), p557-p567). Besides, it is reported that nectin-2 is one of genes involved in the tumor suppressor gene p53 pathway (WO 02/99040), a protein binding to nectin-3 which is a protein useful for treating angiogenesis disorders, cancer or viral infection (WO 02/28902), a receptor involved in viral infection (WO 99/63063), one of genes which are useful for diagnosis and treatment of breast cancer and ovarian cancer (WO 02/00677), one of 16 genes, which expression are enhanced in various cancers and are promising as a target for anti-tumor therapeutic antibodies (WO 03/088808) as well as one of genes, which expression are enhanced in cancer tissue and are promising for diagnosis and prevention of cancer (WO 04/030615). Nectin-2 gene was found as a gene, which expression was markedly increased in cancer tissues. It is reported that antisense oligonucleotide of the gene stimulates apoptosis in cancer cells (WO 2005/097204). As monoclonal antibodies against nectin-2, there are reports of mouse or rat monoclonal antibodies against human nectin-2 (Blood (1998), 92(12), p4602-p4611; J. Virol. (2000) 74 (3) p1267-p1274; Intl. Immunol. (2004) 16 (4), p533-p538; Mol. Immunol. (2005) 42, p463-p469; JEM (2003) 198 (4), p557-p567; Virol. (1998) 246, p179-p189; J. Virol. (2001) 75 (2) p11185-p11195; FEBS (2005) 579, p2243-2249) and monoclonal antibodies against mouse nectin-2 (J. Virol. (2001) 75(2) p11185-p11195; JBC (2001) 276, p48350-p48355; Oncogene (1999) 18, p1609-p1617; JCB (1999) 145, p539-p549; Exp. Cell Res. (1997) 235, p374-p384). However, none of these reports desribed as to the growth inhibitory activity of these antibodies against cancer cells.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

The existing anti-cancer drugs are invariably accompanied by side effects. In clinical work sites, safe drugs that act specifically on cancer cells, have the least affect on normal tissues, and induce growth inhibition of cancer cells alone, are earnestly sought.

In order to solve the foregoing problems, the present inventors made extensive studies and as a result, found the nectin-2 gene as a gene whose expression markedly increases in cancer tissues, and also found that an antisense oligonucleotide of this gene induces apoptosis in cancer cells. The inventors have further succeeded in producing monoclonal antibodies against nectin-2 and found that the monoclonal antibodies have an excellent growth inhibitory activity and so on against cancer cells. As a result of further investigations based on these findings, the inventors have come

to accomplish the present invention.

More specifically, the present invention relates to the following features:

[1] a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α)or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ), its partial peptide, or a salt thereof;

[2] the antibody according to [1] above, which is a monoclonal antibody against a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ), its partial peptide, or a salt thereof;

[3] the antibody according to [1] above, which is a human monoclonal antibody;

[4] the antibody according to [1] above, which is a chimeric monoclonal antibody;

[5] the antibody according to [1] above, which is a humanized monoclonal antibody;

[6] the antibody according to [1] above, which is a monoclonal antibody wherein the constant region of the antibody belongs to human IgG_1 subclass;

[7] the antibody according to [1] above, which has a cancer cell growth inhibitory activity;

[8] the antibody according to [1] above, which has antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC);

[9] the antibody according to [1] above, which has a nectin-2/nectin-3 or nectin-2/nectin-2 trans-binding inhibitory activity;

[10] the antibody according to [1] above, which is a monoclonal antibody capable of recognizing the epitope present in the 1st-350th (extracellular region) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3(nectin-2δ);

[11] the antibody according to [1] above, which is a monoclonal antibody capable of recognizing the epitope present in the 47th-142nd (first immunoglobulin-like domain) or 175th-240th (second immunoglobulin-like domain) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ);

[12] the antibody according to [1] above, which is a monoclonal antibody capable of recognizing the amino acid sequence containing at least one amino acid residue of the 75th, 76th, 77th, 78th, 95th, 137th, 145th, 173rd, 184th, 186th and 212th amino acid residues in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ);

[13] the antibody according to [1] above, wherein the antibody bind competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by

Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1(FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1(FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), to the protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[14] the antibody according to [1] above, which is capable of recognizing the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence recognized by a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427) or Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[15] a hybridoma cell, which is capable of producing the antibody according to [1] above;

[16] the hybridoma cell according to [15] above, which is represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[17] a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell according to [16];

[18] the antibody according to [1] above, which is a recombinant monoclonal antibody;

[19] the antibody according to [1] above, wherein the amino acid sequences of a first complementarity determining region (CDR1), a second complementarity determining region (CDR2) and a third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and

297, and (iii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively;

[19a] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 and SEQ ID NO: 186, respectively;

[19b] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201 and SEQ ID NO: 202, respectively;

[19c] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217 and SEQ ID NO: 218, respectively;

[19d] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 and SEQ ID NO: 234, respectively;

[19e] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 and SEQ ID NO: 250, respectively;

[19f] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region

(CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265 and SEQ ID NO: 266, respectively;

[19g] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281 and SEQ ID NO: 282, respectively;

[19h] the antibody according to [19] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297 and SEQ ID NO: 298, respectively;

[20] the antibody according to [1] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively;

[20a] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 and SEQ ID NO: 194, respectively;

[20b] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region

(CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 and SEQ ID NO: 210, respectively;

[20c] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225 and SEQ ID NO: 226, respectively;

[20d] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241 and SEQ ID NO: 242, respectively;

[20e] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257 and SEQ ID NO: 258, respectively;

[20f] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273 and SEQ ID NO: 274, respectively;

[20g] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289 and SEQ ID NO: 290, respectively;

[20h] the antibody according to [20] above, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity

determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305 and SEQ ID NO: 306, respectively;

[21] a diagnostic agent, which comprises a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[22] the diagnostic agent according to [21] above, which is a diagnostic agent for cancer;

[23] a medicament, which comprises a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[24] the medicament according to [23] above, which is an agent for preventing/treating cancer;

[25] the medicament according to [23] above, which is an apoptosis inducer of cancer cells;

[26] the medicament according to [23] above, which is a growth inhibitor of cancer cells;

[27] the medicament according to [23] above, which is a cytotoxic agent against cancer cells wherein a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody is utilized;

[28] a method for preventing/treating cancer, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[29] a method for inducing apoptosis of cancer cells, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[30] a method for inhibiting growth of cancer cells, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid

sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[31] a method for killing cancer cells through a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof;

[32] use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of an agent for preventing/treating cancer;

[33] use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of an apoptosis inducer of cancer cells;

[34] use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of a growth inhibitor of cancer cells;

[35] use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of a cytotoxic agent against cancer cells through a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody;

[36] An agent for preventing or treating breast cancer which comprises a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[37] An agent for preventing or treating breast cancer which comprises a monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1

(FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[38] The agent for preventing or treating breast cancer according to [37] above, wherein the monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-554-1 (FERM BP-10681) is Nec1-1044-4 (FERM BP-10805) or Nec1-1302-2 (FERM BP-10684);

[39] The agent for preventing or treating breast cancer according to [37] above, wherein the monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) is Nec8-3704-7 (FERM BP-10807) or Nec8-3517-11 (FERM BP-10806);

[40] A method for preventing or treating breast cancer according to [36] or [37] above, wherein a host defense mechanism mediated by the Fc region of the antibody is utilized;

[41] An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively;

[42] An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272,

28

288 and 304, (v) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively;

[43] An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively; wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively; and, a constant region of said antibody;

[44] A hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807);

[45] A monoclonal antibody produced by the hybridoma cell according to [44] above;

[46] A monoclonal antibody binding competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807);

[47] An agent for preventing or treating breast cancer which comprises the monoclonal antibody according to [45] or [46] above;

[48] An agent for preventing or treating breast cancer which comprises an antibody

binding competitively with an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively;

[49] An agent for preventing or treating breast cancer which comprises an antibody binding competitively with an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively;

[50] An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody binding competitively with an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively; wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region

30

(CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively; and, a constant region of said antibody, and so on. The monoclonal antibody against the protein comprising same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, can be safely used as, for example, an agent for preventing/treating cancer (e.g., colorectal cancer, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, esophageal cancer, gastric cancer, liver cancer, biliary tract cancer, spleen cancer, renal cancer, bladder cancer, uterine cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer, brain tumor, blood tumor, etc.) (preferably an agent for preventing/treating breast cancer, lung cancer, colorectal cancer, prostate cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, etc.), an apoptosis inducer of cancer cells, a growth inhibitor of cancer cells, an inducer of cell cycle change in cancer cells, a cytotoxic agent against cancer cells utilizing a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody, an antibody-dependent cytotoxic agent against cancer cells, etc.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows the amino acid sequences (SEQ ID NOS: 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283 and 299) in the H chain variable region and the amino acid sequences (SEQ ID NOS: 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291 and 307) in the L chain variable region, of the antibody of the present invention obtained in EXAMPLE 1.

FIG. 2 shows the base sequences (SEQ ID NOS: 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287 and 303) in the H chain variable region of the antibody of the present invention obtained in EXAMPLE 1.

FIG. 3 shows the base sequences (SEQ ID NOS: 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295 and 311) in the L chain variable region of the antibody of the present invention obtained in EXAMPLE 1.

FIG. 4 shows changes in the mean tumor volume with passage of time after

the cancer cell line transplantation in EXAMPLE 23.

EMBODIMENT OF THE INVENTION

The protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (hereinafter referred to as nectin-2α) or the protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 (hereinafter referred to as nectin-2δ) (hereinafter, these proteins are sometimes collectively referred to as nectin-2 or the protein of the present invention), may be any protein derived from any cells (e.g., hepatocytes, splenocytes, nerve cells, glial cells, β cells of pancreas, bone marrow cells, mesangial cells, Langerhans' cells, epidermic cells, epithelial cells, goblet cells, endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, fibrocytes, myocytes, fat cells, immune cells (e.g., macrophage, T cells, B cells, natural killer cells, mast cells, neutrophils, basophils, eosinophils, monocytes, etc.), megakaryocyte, synovial cells, chondrocytes, bone cells, osteoblasts, osteoclasts, mammary gland cells, hepatocytes or interstitial cells, or the corresponding precursor cells, stem cells, cancer cells, etc.), or any tissues where such cells are present, e.g., brain or any region of the brain (e.g., olfactory bulb, amygdaloid nucleus, basal ganglia, hippocampus, thalamus, hypothalamus, cerebral cortex, medulla oblongata, cerebellum), spinal cord, hypophysis, stomach, pancreas, kidney, liver, gonad, thyroid, gall-bladder, bone marrow, adrenal gland, skin, muscle, lung, gastrointestinal tract (e.g., large intestine and small intestine), blood vessel, heart, thymus, spleen, submandibular gland, peripheral blood, prostate, testis, ovary, placenta, uterus, bone, joint, skeletal muscle, etc., from human and other warm-blooded animals (e.g., guinea pigs, rats, mice, fowl, rabbits, swine, sheep, bovine, monkeys, etc.). The protein may also be a synthetic protein.

The amino acid sequence substantially identical to the same amino acid sequence as that represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 includes amino acid sequences having at least about 50% homology, preferably at least about 60% homology, more preferably at least about 70% homology, still more preferably at least about 80% homology, much more preferably at least about 90% homology and most preferably at least about 95% homology, to the amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3.

Preferred examples of the protein comprising substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID

NO: 3 include proteins comprising substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 and having a property substantially equivalent to that of the protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, etc.

Homology of the amino acid sequences can be measured using a homology scoring algorithm NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) under the following conditions (an expectation value = 10; gaps are allowed; matrix = BLOSUM62; filtering = OFF).

The substantially equivalent is used to mean that the nature of these properties is equivalent in terms of quality (e.g., physiologically or pharmacologically). Thus, the activity of the protein of the present invention is preferably equivalent (e.g., about 0.01 to 100 times, preferably about 0.1 to 10 times, more preferably 0.5 to 2 times), but differences in quantitative factors such as degree of these activities and a molecular weight of the protein may be allowable.

Examples of nectin-2 include so-called muteins such as proteins having (i) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, of which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are deleted; (ii) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, to which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are added; (iii) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are inserted; (iv) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are substituted by other amino acids; or (v) a combination of these amino acid sequences; and the like.

Where the amino acid sequence is inserted, deleted or substituted as described above, the position of its insertion, deletion or substitution is not particularly limited.

Throughout the specification, the proteins are represented in accordance with the conventional way of describing peptides, that is, the N-terminus (amino terminus) at the left hand and the C-terminus (carboxyl terminus) at the right hand.

In the protein used in the present invention including the protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, the C-terminus may be in any form of a carboxyl group (-COOH), a carboxylate ($-COO^-$), an amide ($-CONH_2$) and an ester (-COOR).

Herein, examples of the ester group shown by R include a C_{1-6} alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, etc.; a C_{3-8} cycloalkyl group such as cyclopentyl, cyclohexyl, etc.; a C_{6-12} aryl group such as phenyl, α-naphthyl, etc.; a C_{7-14} aralkyl such as a phenyl-C_{1-2} alkyl group such as benzyl, phenethyl, etc.; an α-naphthyl-C_{1-2} alkyl group such as α-naphthylmethyl, etc.; pivaloyloxymethyl and the like.

Where nectin-2 contains a carboxyl group (or a carboxylate) at a position other than the C-terminus, the carboxyl group may be amidated or esterified and such an amide or ester is also included within nectin-2 used in the present invention. Examples of the ester group in this case may be the C-terminal esters described above, etc.

Furthermore, examples of nectin-2 include variants wherein the amino group at the N-terminal amino acid residues (e.g., methionine residue) is protected with a protecting group (e.g., a C_{1-6} acyl group such as a C_{1-6} alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.); those wherein the N-terminal region is cleaved in vivo and the glutamyl group thus formed is pyroglutaminated; those wherein a substituent (e.g., -OH, -SH, amino group, imidazole group, indole group, guanidino group, etc.) on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group (e.g., a C_{1-6} acyl group such as a C_{1-6} alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.), or conjugated proteins such as glycoproteins having sugar chains; etc.

Specific examples of nectin-2 include a protein (nectin-2α) comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a protein (nectin-2δ) comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, and so on.

The partial peptide of nectin-2 may be any peptide as long as it is a partial peptide of nectin-2 described above and preferably has the property equivalent to that of nectin-2 described above.

For example, in the constituent amino acid sequence of nectin-2, peptides containing, e.g., at least 20, preferably at least 50, more preferably at least 70, much more preferably at least 100 and most preferably at least 200 amino acids, can be used.

The partial peptide of nectin-2 used in the present invention may be peptides containing the amino acid sequence, of which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 20, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids may be deleted; peptides containing the amino acid sequence, to which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 20, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids may be added; peptides containing the amino acid sequence, in which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 20, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids may be inserted; or peptides containing the amino acid sequence, in which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 20, more preferably several and most preferably about 1 to about 5) amino acids may be substituted by other amino acids.

In the partial peptide of nectin-2, the C-terminus may be in any form of a carboxyl group (-COOH), a carboxylate ($-COO^-$), an amide ($-CONH_2$) or an ester (-COOR).

Furthermore, the partial peptide of nectin-2 includes those having a carboxyl group (or a carboxylate) at a position other than the C-terminus, those wherein the amino group at the N-terminal amino acid residues (e.g., methionine residue) is protected with a protecting group; those wherein the N-terminal region is cleaved in vivo and the glutamyl group thus formed is pyroglutaminated; those wherein a substituent on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group, or conjugated peptides such as so-called glycopeptides in which sugar chains are conjugated; etc., as in nectin-2 described above.

As salts of nectin-2 or its partial peptides, salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids or organic acids) or bases (e.g., alkali metal salts) may be employed, preferably in the form of physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts include salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid), salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid), and the like.

The monoclonal antibodies against nectin-2, its partial peptide or salts thereof (hereinafter sometimes briefly referred to as the antibody of the present invention) may be any of monoclonal antibodies, as long as they are antibodies capable of recognizing nectin-2, its partial peptide or salts thereof. Among them, human monoclonal antibodies are preferably used.

Also, examples of the antibodies of the present invention include a monoclonal antibodies (specifically, human monoclonal antibodies), against nectin-2δ, its partial peptide or salts thereof.

Furthermore, antibodies having at least one of the following properties (1) to (8) are preferably employed as the antibody of the present invention.

(1) An antibody having the growth inhibitory activity against cancer cells (e.g., human cancer cell OV-90)

(2) An antibody having the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

(3) An antibody having the inhibitory activity against the cis-binding of nectin-2

Specifically, these antibodies:

(i) inhibit homo-cis-binding of nectin-2α;

(ii) inhibit homo-cis-binding of nectin-2δ; or,

(iii) inhibit hetero-cis-binding of nectin-2α and nectin-2δ.

(4) An antibody having an inhibitory activity against the nectin-2/nectin-3 or nectin-2/nectin-2 trans-binding

Specifically, these antibodies:

(i) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2α and a homo-cis-dimer of nectin-2α;

(ii) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2α and a homo-cis-dimer of nectin-2δ;

(iii) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2α and a hetero-cis-dimer of nectin-2α and nectin-2δ;

(iv) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2α and a homo-cis-dimer of the nectin-3;

(v) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2δ and a homo-cis-dimer of nectin-2δ;

(vi) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2δ and a hetero-cis-dimer of nectin-2α and nectin-2δ;

(vii) inhibit trans-binding of a homo-cis-dimer of nectin-2δ and a homo-cis-dimer of nectin-3;

(viii) inhibit trans-binding of a hetero-cis-dimer of nectin-2α and nectin-2δ and a homo-cis-dimer of nectin-3; or,

(ix) inhibit trans-binding of a hetero-cis-dimer of nectin-2α and nectin-2δ and a hetero-cis-dimer of nectin-2α and nectin-2δ.

(5) An antibody belonging to any of the epitope groups I to VII shown in EXAMPLE

4 or the epitope subgroup shown in EXAMPLE 18

Preferably, the antibody belongs to the epitope group IV, VI or VII shown in EXAMPLE 4. More preferably, the antibody belongs to the epitope subgroup IVb, VIb or VIIa shown in EXAMPLE 18.

(6) An antibody recognizing the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence which is recognized by a monoclonal antibody (antibody belonging to the epitope group I, IV, V, VI or VII in Table. 4) produced by the hybridoma cell shown by:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),
Nec1-244-3 (FERM BP-10423),
Nec1-530-1 (FERM BP-10424),
Nec1-903-1 (FERM BP-10425),
Nec1-520-1 (FERM BP-10426),
Nec1-845-2 (FERM BP-10427),
Nec1-834-1 (FERM BP-10428),
Nec1-964-1 (FERM BP-10683),
Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),
Nec1-554-1 (FERM BP-10681),
Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or,
Nec8-4116-8 (FERM BP-10685)

In "the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence (hereinafter the latter amino acid is merely referred to as the epitope) which is recognized by a monoclonal antibody (antibody belonging to the epitope I, IV, V, VI or VII in FIG. 4) produced by a hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1(FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685)), the term "substantially the same amino acid sequence as the epitope " includes (i) the amino acid sequence, of which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids in the epitope are deleted; (ii) the amino acid sequence, to which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids s in the epitope are added; (iii) the amino acid sequence, in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids s in the epitope are inserted; (iv) the

amino acid sequence, in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids s in the epitope are substituted by other amino acids; or (v) a combination of (i)-(iv) amino acid sequences; and the like. The position of its insertion, addition, deletion or substitution described above is not particularly limited.

More specifically, the term "substantially the same amino acid sequence as an epitope" includes amino acid sequences near the epitope and includes, for example, (i) the amino acid sequence in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids are added to the N-terminal side of the epitope site; (ii) the amino acid sequence in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids are added to the C-terminal side of the epitope; (iii) the amino acid sequence in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids are added to the amino acid sequence of amino acid sequences (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) at the N-terminal side within the epitope; or (iv) the amino acid sequence in which at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) amino acids are added to the amino acid sequence of amino acid sequences (e.g., about 1 to about 10, preferably several (1 to 5)) at the C-terminal side within the epitope; and the like.

For example, each monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) and other monoclonal antibodies belonging to the same group as the group to which the aforesaid monoclonal antibody belongs are considered to recognize the same or substantially the same amino acid sequence as said monoclonal antibody.

(7) Antibody which is competitive with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell shown by:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),

Nec1-244-3 (FERM BP-10423),

Nec1-530-1 (FERM BP-10424),

Nec1-903-1 (FERM BP-10425),

Nec1-520-1 (FERM BP-10426),
Nec1-845-2 (FERM BP-10427),
Nec1-834-1 (FERM BP-10428),
Nec1-964-1 (FERM BP-10683),
Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),
Nec1-554-1 (FERM BP-10681),
Nec1-769-2 (FERM BP-10682), or
Nec8-4116-8 (FERM BP-10685),

for binding to nectin-2α or nectin-2δ.

Herein, the term "antibody which is competitive with a monoclonal antibody produced by each hybridoma cell for binding to nectin-2α or nectin-2δ" refers to an antibody, which binding to nectin-2α or nectin-2δ is competitively inhibited by adding an excess of any one of the 12 antibodies described above. Specifically, the antibody refers to, for example, an antibody showing approximately 50-100% binding inhibition, when 50-fold molar amount of any one of the 12 antibodies described above is added to said antibody.

(8) A monoclonal antibody comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence of a monoclonal antibody produced by hybridoma cell shown by:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),
Nec1-244-3 (FERM BP-10423),
Nec1-530-1 (FERM BP-10424),
Nec1-903-1 (FERM BP-10425),
Nec1-520-1 (FERM BP-10426),
Nec1-845-2 (FERM BP-10427),
Nec1-834-1 (FERM BP-10428),
Nec1-964-1 (FERM BP-10683),
Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),
Nec1-554-1 (FERM BP-10681),
Nec1-769-2 (FERM BP-10682), or
Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

Herein, the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence (hereinafter amino acid sequence A) of the monoclonal antibody described above includes amino acid sequences having at least about 50% homology, preferably at least about 60% homology, more preferably at least about

70% homology, still more preferably at least about 80% homology, much more preferably at least about 90% homology and most preferably at least about 95% homology, to the amino acid sequence A; etc.

Examples of the antibody comprising substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence A include an antibody comprising substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence A and having an activity substantially equivalent to the protein comprising the amino acid sequence A; and the like.

Homology of the amino acid sequences can be measured using a homology scoring algorithm NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) under the following conditions (an expectation value = 10; gaps are allowed; matrix = BLOSUM62; filtering = OFF).

The term substantially equivalent is used to mean that the nature of these properties is equivalent in terms of quality (e.g., physiologically or pharmacologically). Thus, the activity of protein used in the present invention is preferably equivalent (e.g., about 0.01 to 100 times, preferably about 0.1 to 10 times, more preferably 0.5 to 2 times), but differences in quantitative factors such as degree of these activities and a molecular weight of the protein may be allowable.

Examples of the monoclonal antibody comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence A include antibody containing (i) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are deleted of the amino acid sequence A; (ii) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are added to the amino acid sequence A; (iii) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are inserted into the amino acid sequence A; (iv) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids in the amino acid sequence A are substituted by other amino acids; or (v) a combination of these amino acid sequences; and the like.

The antibody of the present invention includes a chimeric antibody, humanized antibody, human antibody and antibody fragment. The "chimeric

antibody" means an antibody which has the variable regions derived from antibody of different species and constant regions of human antibody (see, e.g., EP 0125023, etc.). The "humanized antibody" refers to an antibody designed to modify a heterologous antibody like a mouse antibody by replacing its primary structure other than the complementarity determining regions of H chain and L chain with the corresponding primary structure of a human antibody. The "human antibody" refers to a monoclonal antibody prepared using a transgenic animal carrying human antibody genes (see EP0546073) and a monoclonal antibody prepared using a library in which a human antibody gene is presented on the cell surface of bacteriophage, Escherichia coli, yeast, animal cells, etc., a so-called antibody display technology (Nature Biotechnology 23, 1105 (2005)) and a monoclonal antibody isolated from human B cells producing an antibody against nectin-2 using cell fusion method, phage display method, or the like.

In the present invention, the "antibody fragment" refers to a part of the full-length antibody, and generally means a fragment containing antigen-binding regions or variable regions. The antibody fragment includes, for example, Fab, Fab', $F(ab')_2$, a single chain antibody (scFv), disulfide-stabilized antibody (dsFv), etc.

The antibody in accordance with a preferred embodiment of the present invention recognizes an epitope present in the 1st-350th (extracellular domain) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ); an epitope present in the 47th-142nd (first immunoglobulin-like domain) or 175th-240th (second immunoglobulin-like domain) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ); or the amino acid sequence containing at least one amino acid residue from the 75th, 76th, 77th, 78th, 95th, 137th, 145th, 173rd, 184th, 186th and 212th amino acid residues in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1(nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ).

The present invention further provides a monoclonal antibody comprising a specific CDR amino acid sequence or a variable region amino acid sequence. The present invention still further provides a monoclonal antibody light chain or its fragment, and a monoclonal antibody heavy chain or its fragment, comprising a specific CDR amino acid sequence.

At the N-terminal sides of the heavy and light chains, there are variable regions which are called a heavy chain variable region (VH) and a light chain variable region (VL), respectively. In the variable region, there is a

complementarity determining region (CDR) and this part is responsible for the specificity of antigen recognition. A part of the variable region other than CDR functions to retain the structure of CDR and is called a framework region (FR). At the C-terminal sides of the heavy and light chains, there are constant regions which are called a heavy chain constant region (CH) and a light chain constant region (CL), respectively. In the heavy chain variable region, there are three complementarity determining regions: the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2), and the third complementarity determining region (CDR3). The three complementarity determining regions in the heavy chain variable region are collectively called a heavy chain complementarity determining region. Likewise, there are three complementarity determining regions in the light chain variable region, which are the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2), and the third complementarity determining region (CDR3). These three complementarity determining regions in the light chain variable region are collectively called a light chain complementarity determining region.

Specifically, in the antibody in accordance with a preferred embodiment of the present invention, the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively.

Furthermore, in the antibody in accordance with another preferred embodiment of the present invention, the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) the sequence identification

number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively.

The CDR sequences from the antibody of the present invention are not necessarily limited but include those given in TABLES 21 and 22 later described, as suitable combinations of amino acid sequences of VH CDR1, VH CDR2 and VH CDR3 and suitable combinations of amino acid sequences of VL CDR1, VL CDR2 and VL CDR3. Amino acid sequences other than CDR are not particularly limited but the antibody of the present invention includes a so-called CDR grafted antibody in which amino acid sequences other than CDR are derived from another antibody, especially from an antibody of different species. Human-derived amino acid sequences are preferred as the amino acid sequences other than CDR and may be accompanied, if necessary, by the addition, deletion, substitution and/or insertion of one or more amino acid residues in the framework region (FR).

The amino acid sequence and base sequence in the variable regions of the antibody of the present invention are preferably those given in TABLE 25.

The monoclonal antibody comprising a specific CDR amino acid sequence or variable region amino acid sequence of the antibody of the present invention can be prepared using known methods.

The antibody of the present invention includes preferably a monoclonal antibody, in which the constant regions of the antibody belong to preferably a human antibody, more preferably human IgG and most preferably human IgG1 subclass.

The antibody against nectin-2, its partial peptide, or salts thereof (which are sometimes briefly referred to as nectin-2 in the following description of the antibody) can be prepared by publicly known methods for manufacturing antibodies or antisera.

The preparation of an antigen for the antibody of the present invention and preparation of the antibody will be described below.

(1) Preparation of antigen

As the antigen used to prepare the antibody of the present invention, for example, any one of the antigens such as a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 (nectin-2), its partial peptide, or salts thereof, a cell line or its membrane fraction wherein the protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3

(nectin-2) is highly expressed naturally or artificially, a fusion protein of the extracellular domain protein of nectin-2 and the other protein or peptide, or salts thereof, a (synthetic) peptide having one or more antigenic determinants, which are the same as in nectin-2, etc. can be used (hereinafter these antigens are sometimes merely referred to as the antigen of the present invention).

Specific examples of the antigen of the present invention, which can be preferably used, include a cell line or its membrane fraction wherein nectin-2 is highly expressed naturally or artificially, an extracellular domain protein of nectin-2 or salts thereof, a fusion protein of the extracellular domain protein of nectin-2 and the other protein or peptide, or a (synthetic) peptide having one or more antigenic determinants, which are the same as in nectin-2, etc.

Examples of the other protein or peptide include FLAG-tag, His-tag, Myc-tag, V5-tag, GST-tag, S-tag, T7-tag, or the Fc regions of human antibody, mouse antibody, etc., and so on.

Although the length of such (synthetic) peptide is not limited so long as it is such a length as having immunogenicity, the peptide is preferably a peptide having, e.g., 6, preferably 10 and more preferably 12 consecutive amino acid residues.

Nectin-2 or its partial peptide, or salts thereof may be manufactured by publicly known methods or their modifications used to purify proteins from human or warm-blooded animal cells or tissues described above. Alternatively, they may also be manufactured by culturing transformants bearing DNAs encoding these proteins. And, they may also be manufactured according to methods for peptide synthesis described below. In addition, they may also be manufactured by culturing transformants bearing DNAs encoding a fusion protein of extracellular domain protein of nectin-2 and the other protein or peptide.

(a) Where the antigen of the present invention or salts thereof are prepared from tissues or cells of human or warm-blooded animals (e.g., guinea pigs, rats, mice, fowl, rabbits, swine, sheep, bovine, monkeys, etc.), the tissues or cells are homogenized and the crude fraction (e.g., its membrane fraction or soluble fraction) can be used as an antigen in its intact form. Alternatively, the homogenate is extracted with an acid, a surfactant, an alcohol, etc. and the extract is then purified and isolated by a combination of salting out, dialysis, gel filtration, chromatography techniques such as reverse phase chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and the like.

(b) Where nectin-2 or fusion protein of the extracellular domain protein of nectin-2

and the other protein (peptide), or salts thereof, are prepared using transformants bearing DNA, the DNA can be prepared by publicly known method [e.g., the method described in Molecular Cloning, (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc.].

For cloning of DNAs that completely encode nectin-2 or its partial peptide (hereinafter sometimes merely referred to as nectin-2 in the description of cloning of DNAs encoding the same and their expression), the DNA can be either amplified by PCR using synthetic DNA primers containing a part of the base sequence encoding nectin-2, or the DNA inserted into an appropriate vector can be selected by hybridization with a labeled DNA fragment or synthetic DNA that encodes a part or entire region of nectin-2. A template polynucleotide used for PCR may be any one so long as it contains a base sequence encoding nectin-2. The polynucleotide may also be any one of genomic DNA, genomic DNA library, cDNA derived from the cells or tissues described above, cDNA library derived from the cells or tissues described above and a synthetic DNA.

The hybridization can be carried out by publicly known methods or modifications thereof, for example, by the method described in Molecular Cloning, 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc. A commercially available library can also be used according to the instructions of the attached manufacturer's protocol. More preferably, the hybridization can be carried out under high stringent conditions.

The high stringent conditions are, for example, those in a sodium concentration at about 19 to 40 mM, preferably about 19 to 20 mM at a temperature of about 50 to 70°C, preferably about 60 to 65°C. In particular, hybridization conditions in a sodium concentration at about 19 mM at a temperature of about 65°C are most preferred.

More specifically, there are employed (i) a DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO: 2, etc. as the DNA encoding the protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α); and (ii) a DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO: 4, etc. as the DNA encoding the protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ).

Substitution of the base sequence of DNA can be performed by publicly known methods such as the ODA-LA PCR method, the Gapped duplex method, the Kunkel method, etc., or its modification, using PCR, a publicly known kit available

as Mutan™-super Express Km (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) or Mutan™-K (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), etc.

The cloned DNA encoding nectin-2 can be used as it is, depending upon purpose or, if desired, after digestion with a restriction enzyme or after addition of a linker thereto. The DNA may contain ATG as a translation initiation codon at the 5' end thereof and TAA, TGA or TAG as a translation termination codon at the 3' end thereof. These translation initiation and termination codons may also be added by using an appropriate synthetic DNA adapter. Where the DNA encoding the fusion protein of the extracellular domain of nectin-2 and the other protein (peptide) or its salt, the DNA encoding the nectin-2 extracellular domain cloned or synthesized by the same method as described above is ligated with a DNA encoding the other protein (peptide) by publicly known methods or their modifications.

The expression vector for nectin-2 can be manufactured, for example, by (a) excising the desired DNA fragment from the DNA encoding nectin-2, and then (b) ligating the DNA fragment with an appropriate expression vector downstream a promoter in the vector.

Examples of the vector include plasmids derived form E. coli (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), plasmids derived from Bacillus subtilis (e.g., pUB110, pTP5, pC194), plasmids derived from yeast (e.g., pSH19, pSH15), bacteriophages such as λ phage, etc., animal viruses such as retrovirus, vaccinia virus, insect viruses such as baculovirus, etc. as well as pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA I/Neo, etc.

The promoter used in the present invention may be any promoter if it matches well with a host to be used for gene expression. In the case of using animal cells as the host, examples of the promoter include SRα promoter, SV40 promoter, LTR promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter, etc.

Among them, it is preferred to use CMV (cytomegalovirus) promoter, SRα promoter, etc. Where the host is bacteria of the genus Escherichia, preferred examples of the promoter include trp promoter, lac promoter, recA promoter, λP_L promoter, lpp promoter, T7 promoter, etc. In the case of using bacteria of the genus Bacillus as the host, preferred example of the promoter are SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter, etc. When yeast is used as the host, preferred examples of the promoter are PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter, etc. When insect cells are used as the host, preferred examples of the promoter include polyhedrin prompter, P10 promoter, etc.

46

In addition to the foregoing examples, the expression vector may further optionally contain an enhancer, a splicing signal, a poly A addition signal, a selection marker, SV40 replication origin (hereinafter sometimes abbreviated as SV40ori), etc. Examples of the selection marker include dihydrofolate reductase (hereinafter sometimes abbreviated as dhfr) gene [methotrexate (MTX) resistance], ampicillin resistant gene (hereinafter sometimes abbreviated as Amp^r), neomycin resistant gene (hereinafter sometimes abbreviated as Neo^r, G418 resistance), etc. In particular, when dhfr gene is used as the selection marker using dhfr gene-deficient Chinese hamster cells, selection can also be made on a thymidine free medium.

If necessary, a signal sequence that matches a host is added to the N-terminal side of nectin-2. Examples of the signal sequence that can be used are PhoA signal sequence, OmpA signal sequence, etc. when the host is a bacterium of the genus Escherichia; α-amylase signal sequence, subtilisin signal sequence, etc. when the host is a bacterium of the genus Bacillus; MFα signal sequence, SUC2 signal sequence, etc. when the host is yeast; and insulin signal sequence, α-interferon signal sequence, antibody molecule signal sequence, etc. when the host is an animal cell, respectively.

Using the vector containing the DNA encoding nectin-2 thus constructed, transformants can be manufactured.

Examples of the host, which may be employed, are bacteria belonging to the genus Escherichia, bacteria belonging to the genus Bacillus, yeast, insect cells, insects, animal cells, etc.

Specific examples of the bacteria belonging to the genus Escherichia include Escherichia coli K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], etc.

Examples of the bacteria belonging to the genus Bacillus include Bacillus subtilis MI114 [Gene, 24, 255 (1983)], 207-21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)], etc.

Examples of yeast include Saccharomyces cereviseae AH22, $AH22R^-$, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, Schizosaccharomyces pombe NCYC1913, NCYC2036, Pichia pastoris KM71, etc.

Examples of insect cells include, for the virus AcNPV, Spodoptera frugiperda cell (Sf cell), MG1 cell derived from mid-intestine of Trichoplusia ni,

High Five™ cell derived from egg of Trichoplusia ni, cells derived from Mamestra brassicae, cells derived from Estigmena acrea, etc.; and for the virus BmNPV, Bombyx mori N cell (BmN cell), etc. is used. Examples of the Sf cell which can be used are Sf9 cell (ATCC CRL1711), Sf21 cell (both cells are described in Vaughn, J. L. et al., In Vivo, 13, 213-217 (1977)), etc.

As the insect, for example, a larva of Bombyx mori can be used [Maeda et al., Nature, 315, 592 (1985)].

Examples of animal cells include simian cell COS-7, Vero, Chinese hamster cell CHO (hereinafter referred to as CHO cell), dhfr gene-deficient Chinese hamster cell CHO (hereinafter simply referred to as CHO (dhfr$^-$) cell), mouse L cell, mouse AtT-20, mouse myeloma cell, mouse ATDC5 cell, mouse NS0 cell, mouse FM3A cell, rat GH3 cell, human FL cell, human embryonic HEK293 cell, human embryonic 293F cell, etc.

Bacteria belonging to the genus Escherichia can be transformed, for example, by the method described in Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972), Gene, 17, 107 (1982), etc.

Bacteria belonging to the genus Bacillus can be transformed, for example, by the method described in Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979), etc.

Yeast can be transformed, for example, by the method described in Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1929 (1978), etc.

Insect cells or insects can be transformed, for example, according to the method described in Bio/Technology, 6, 47-55(1988), etc.

Animal cells can be transformed, for example, according to the method described in Saibo Kogaku (Cell Engineering), extra issue 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263-267 (1995) (published by Shujunsha), or Virology, 52, 456 (1973).

Thus, the transformants transformed with the expression vectors bearing the DNAs encoding nectin-2 can be obtained.

Where the host is a bacterium belonging to the genus Escherichia or the genus Bacillus, the transformant can be appropriately cultured in a liquid medium which contains materials required for growth of the transformant such as carbon sources, nitrogen sources, inorganic materials, and the like. Examples of the carbon sources include glucose, dextrin, soluble starch, sucrose, etc.; examples of the nitrogen sources include inorganic or organic materials such as ammonium salts,

nitrate salts, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean cake, potato extract, etc.; and, examples of the inorganic materials are calcium chloride, sodium dihydrogenphosphate, magnesium chloride, etc. In addition, yeast extracts, vitamins, growth promoting factors etc. may also be added to the medium. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 5 to about 8.

A preferred example of the medium for culturing the bacteria belonging to the genus Escherichia is M9 medium supplemented with glucose and Casamino acids [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972]. If necessary, a chemical such as 3β-indolylacrylic acid can be added to the medium thereby to activate the promoter efficiently.

Where the host is a bacterium belonging to the genus Escherichia, the transformant is usually cultivated at about 15 to 43°C for about 3 to 24 hours. If necessary, the culture may be aerated or agitated.

Where the host is a bacterium belonging to the genus Bacillus, the transformant is cultured generally at about 30 to 40°C for about 6 to 24 hours. If necessary, the culture can be aerated or agitated.

Where the host is yeast, the transformant is cultivated, for example, in Burkholder's minimal medium [Bostian, K. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4505 (1980)] or in SD medium supplemented with 0.5% Casamino acids [Bitter, G. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5330 (1984)]. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 5 to 8. In general, the transformant is cultivated at about 20 to 35°C for about 24 to 72 hours. If necessary, the culture can be aerated or agitated.

Where the host is an insect cell or insect, the transformant is cultivated in, for example, Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) to which an appropriate additive such as 10% heat-inactivated bovine serum is added. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 6.2 to about 6.4. Normally, the transformant is cultivated at about 27°C for about 3 days to about 5 days and, if necessary, the culture can be aerated or agitated.

Where the host is an animal cell, the transformant is cultured in, for example, MEM medium [Science, 122, 501 (1952)], DMEM medium [Virology, 8, 396 (1959)], RPMI 1640 medium [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], 199 medium [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], etc., containing about 5 to 20% fetal bovine serum. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 6 to about 8. The transformant is usually cultivated at

about 30°C to about 40°C for about 15 to 60 hours and, if necessary, the culture can be aerated or agitated.

As described above, nectin-2 can be produced in the transformant, on the cell membrane of the transformant, or outside of the transformant.

Nectin-2 can be separated and purified from the culture described above by the following procedures.

When nectin-2 is extracted from the bacteria or cells, the bacteria or cells are collected after culturing by publicly known methods and suspended in an appropriate buffer. The bacteria or cells are then disrupted by publicly known methods such as ultrasonication, a treatment with lysozyme and/or freeze-thaw cycling, followed by centrifugation, filtration, etc to produce crude extract of the protein. The buffer used for the procedures may contain a protein modifier such as urea or guanidine hydrochloride, or a surfactant such as Triton X-100™, etc. When nectin-2 is secreted in the culture broth, the supernatant can be separated, after completion of the cultivation, from the bacteria or cells to collect the supernatant by publicly known methods.

Nectin-2 contained in the supernatant or the extract thus obtained can be purified by appropriately combining the publicly known methods for separation and purification. Such publicly known methods for separation and purification include a method utilizing difference in solubility such as salting out, solvent precipitation, etc.; a method mainly utilizing difference in molecular weight such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration, etc.; a method utilizing difference in electric charge such as ion exchange chromatography, etc.; a method utilizing difference in specific affinity such as affinity chromatography, etc.; a method utilizing difference in hydrophobicity such as reverse phase chromatography, etc.; a method utilizing difference in isoelectric point such as chromatofocusing; and the like.

When nectin-2 thus obtained is in a free form, nectin-2 can be converted into its salt by publicly known methods or modifications thereof. On the other hand, when nectin-2 is obtained in the form of a salt, it can be converted into its free form or in the form of a different salt by publicly known methods or modifications thereof.

Nectin-2 produced by the recombinant can be treated, prior to or after the purification, with an appropriate protein-modifying enzyme so that nectin-2 can be optionally modified or the polypeptide may be partially removed. Examples of the protein-modifying enzyme include trypsin, chymotrypsin, arginyl endopeptidase, protein kinase, glycosidase, and the like.

50

The presence of the thus produced nectin-2 can be determined by enzyme immunoassay, western blotting using a specific antibody, etc.

(c) Mammalian cells which express nectin-2 can also be used directly as the antigen of the present invention. As the mammalian cells, there can be used the naturally occurring cells as described in (a) above, cells transformed by the methods as described in (b) above, etc. Hosts used for the transformation may be any cells as far as they are cells collected from human, simian, rat, mouse, hamster, etc. and preferably used are HEK293, COS7, CHO-K1, NIH3T3, Balb3T3, FM3A, L929, SP2/0, P3U1, NS0, B16, P388, or the like.

(d) The (synthetic) peptide having one or more antigenic determinants, which are the same as in nectin-2, or its salt, can be manufactured by publicly known methods for peptide synthesis or by cleaving nectin-2 with an appropriate peptidase. For the methods for peptide synthesis, for example, either solid phase synthesis or liquid phase synthesis may be used. That is, the partial peptide or amino acids that can construct the peptide are condensed with the remaining part. Where the product contains protecting groups, these protecting groups are removed to give the desired peptide. Publicly known methods for condensation and elimination of the protecting groups are described in (i) to (v) below.

(i) M. Bodanszky & M.A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

(ii) Schroeder & Luebke: The Peptide, Academic Press, New York (1965)

(iii) Nobuo Izumiya, et al.: *Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken* (Basics and experiments of peptide synthesis), published by Maruzen Co. (1975)

(iv) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: *Seikagaku Jikken Koza* (Biochemical Experiment) 1, *Tanpakushitsu no Kagaku* (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

(v) Haruaki Yajima, ed.: *Zoku Iyakuhin no Kaihatsu* (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, published by Hirokawa Shoten

After completion of the reaction, the partial peptide used in the present invention may be purified and isolated by a combination of conventional purification methods such as solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography and recrystallization. When the partial peptide obtained by the above methods is in a free form, the partial peptide can be converted into an appropriate salt by a publicly known method or its modification; conversely when the partial peptide is obtained in a salt form, it can be converted into a free form or

other different salt form by a publicly known method or its modification.

(2) Production of monoclonal antibody

(a) Establishment of monoclonal antibody-producing cells by the hybridoma method

The antigen of the present invention is administered to warm-blooded animals. Immunization may be done by any method, as long as it can stimulate antibody production, and preferably used are intravenous injection, intraperitoneal injection, intramuscular injection, subcutaneous injection, intradermal injection, footpad injection, etc.

Naturally occurring mammalian cells or transformed mammalian cells, which express the protein of the present invention, can be injected to animal for immunization as a suspension of the cells in a medium used for tissue culture (e.g., RPMI 1640) or buffer (e.g., Hanks' balanced salt solution).

The antigen of the present invention may be provided for direct immunization in its immobilized form. The antigen of the present invention may also be bound or adsorbed to an appropriate carrier and the complex produced can be provided for immunization. A mixing ratio of the carrier to the antigen of the present invention (hapten) may be in any ratio of any type, as long as the antibody can be efficiently produced to the antigen of the present invention which is bound or adsorbed to the carrier. A naturally occurring or synthetic high molecular carrier conventionally used to produce an antibody against a hapten may be used in a weight ratio of 0.1 to 100 against 1 of hapten. Examples of the naturally occurring high molecular carrier, which can be used, are serum albumin from mammals such as bovine, rabbit, human, etc., thyroglobulins from mammals such as bovine, rabbit, etc., hemoglobins from mammals such as bovine, rabbit, human, sheep, etc or keyhole limpet hemocyanin. Examples of the synthetic high molecular carrier, which can be used, are various latexes including polymers, copolymers, etc., such as polyamino acids, polystyrenes, polyacryls, polyvinyls, polypropylenes, etc.

For coupling of the hapten and the carrier, a variety of condensing agents can be used. Examples of the condensing agents, which are advantageously employed, are diazonium compounds such as bis-diazotized benzidine capable of crosslinking tyrosines, histidines or tryptophans; dialdehyde compounds such as glutaraldehyde and diisocyanate compounds such as toluene-2,4-diisocyanatecapable of crosslinking amino groups with each other;dimaleimide compounds such as N,N'-o-phenylenedimaleimide, etc., capable of crosslinking thiols with each other;

maleimide activated ester compounds capable of crosslinking an amino group with a thiol group; carbodiimide compounds capable of crosslinking an amino group with a carboxyl group; etc. In the crosslinking of amino groups with each other, a thiol group is introduced into one amino group by reacting with an activated ester reagent (e.g., N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), etc.) having dithiopyridyl group, followed by reduction, whereas a maleimide group in introduced into another amino group using a maleimide activated ester reagent, and the two groups may be reacted with each other.

When the antigen of the present invention is administered, in order to potentiate the antibody productivity of an immune animal, the antigen of the present invention may be mixed with an adjuvant such as complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant, Alum, a Ribi adjuvant, etc. and the resulting mixture or emulsion may be administered to the animal. The administration is usually made once every about 2 to 6 weeks and about 2 to 10 times in total. Further in producing the monoclonal antibody of the present invention, DNA immunization may be used (see, e.g., Nature, 356, 152-154). Examples of the applicable warm-blooded animals are monkeys, rabbits, dogs, guinea pigs, mice, rats, hamster, sheep, goats, camel, lama and fowl, with the use of mice and rats being preferred for producing the monoclonal antibody. These warm-blooded animals may be wild or KO animals wherein the warm-blooded animal ortholog genes of antigen proteins are knockout to achieve a stronger immune response against the antigen. Also, transgenic animals wherein antibody genes of warm-blooded animals are knockout and human antibody genes are introduced (see EP0546073), knock-in animals (WO 02/098217, WO 03/020743), etc. may be used to produce human monoclonal antibodies.

In preparation of the monoclonal antibody-producing cells, an warm-blooded animal, e.g., a mouse, wherein the antibody titer is noted is selected from animals immunized with the antigen, then spleen or lymph node is collected 2 to 5 days afterthe final immunization. The antibody-producing B cells contained therein are fused with myeloma cells derived from the same or different species, whereby hybridomas producing the monoclonal antibody can be established. The antibody titer in antisera may be determined by any method, so long as the amount of antibody specifically binding to the antigen can be quantified. As will be later described, the antibody titer can be determined, for example, by reacting an immobilized protein antigen or antigen-expressing cell line with antiserum and then

measuring the level of antibody bound to them using a labeled anti-immunoglobulin antibody. The fusion may be carried out in accordance with known methods, e.g., by Koehler and Milstein [Nature, 256, 495 (1975)]. Examples of the fusion accelerator are polyethylene glycol (PEG), Sendai virus, etc., and PEG is preferably employed.

Examples of the myeloma cells are those collected from warm-blooded animals such as NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1, etc. In particular, SP2/0 and P3U1 are preferably employed. A preferred ratio of the number of the antibody-producing cells used (spleen cells) to the number of myeloma cells is within a range of approximately 1:1 to 20:1. When PEG (preferably, PEG 1000 to PEG 6000) is added in a concentration of approximately 10 to 80% followed by incubation at 20 to 40°C, preferably at 30 to 37°C for 1 to 10 minutes, an efficient cell fusion can be carried out.

For cell fusion operations to establish the monoclonal antibody-producing cells, electrofusion may also be employed.

The screening of hybridomas can be performed by publicly known methods or their modifications. The screening of hybridomas can be performed normally in a medium for animal cells supplemented with HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine). As a screening and growth medium, any medium can be employed as far as the hybridoma can grow there. For example, RPMI 1640 medium containing 1 to 20%, preferably 10 to 20% fetal bovine serum, GIT medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) containing 1 to 10% fetal bovine serum, a serum free medium for culture of a hybridoma (SFM-101, Nissui Seiyaku Co., Ltd.) and the like, can be used. The culture is carried out generally at a temperature of 20 to 40°C, preferably at 37°C, for about 5 days to about 3 weeks, preferably 1 to 2 weeks. Culture can be carried out normally in 5% carbon dioxide gas.

Various methods can be used for screening of the monoclonal antibody-producing hybridomas. Examples of such methods include a method which involves adding the supernatant of a hybridoma to a solid phase (e.g., microplate) adsorbed with a soluble protein antigen or protein antigen-expressing cell, directly or together with a carrier, followed by the reaction with an anti-immunoglobulin antibody (for example, when spleen cells used for the cell fusion are from mouse, an anti-mouse immunoglobulin antibody is used) labeled with a radioactive substance, an enzyme, a fluorescent substance, etc., or with Protein A, and detecting the monoclonal antibody bound to the solid phase; a method

which involves adding the hybridoma supernatant to a solid phase adsorbed with an anti-immunoglobulin antibody or Protein A, followed by the reaction with a soluble protein antigen labeled with a radioactive substance, an enzyme, or a fluorescent substance, etc. and detecting the antigen-specific monoclonal antibody bound to the solid phase; etc. When the protein antigen-expressing cell is used, the hybridoma culture supernatant is added to the cell, followed by the reaction with a fluorescence-labeled anti-immunoglobulin antibody, and the fluorescence intensity of the cell is assayed on a fluorescence detector such as a flow cytometer, etc. Thus, the monoclonal antibody bound to the protein antigen on the cell membrane can be detected.

(b) Production of monoclonal antibody by other methods

The method for producing the antibody of the present invention is not limited to the method described in (a), but for example, a so-called antibody display technology, which involves presenting an antibody gene library prepared by publicly known methods using B lymphocyte of human or warm-blooded animal (e.g., monkey, rabbit, dog, guinea pig, mouse, rat, hamster, sheep, goat, camel, lama, fowl, etc.) as a material, on the cell surface of bacteriophage, Escherichia coli, yeast, animal cells, etc or on ribosome [Nature Biotechnology 23, 1105 (2005)] can be used. Human or warm-blooded animals may be naïve ones, patients carrying cancer which highly expressing the antigen of the present invention , or warm-blooded animals which are immunized with the antigen of the present invention by the method described in (a). The form of antibodies presented on the cell surface includes but is not limited to IgG molecules, IgM molecules, Fab fragments, single chain Fv (scFv) fragments, etc.

The gene for the monoclonal antibody (fragment) capable of specifically binding to the antigen of the present invention can be obtained as follows. The aforesaid antibody (fragment)-presenting cell or antibody (fragment)-presenting ribosome carrying antibody gene library is reacted with the antigen of the present invention for a given period of time, followed by removing non-specifically bound substances by washing. After eluting and recovering the product bound specifically to the antigen of the present invention, the antibody (fragment)-presenting cell or antibody (fragment)-presenting ribosome is allowed to grow. The same procedure is repeated several times, and finally the aimed gene can be isolated from the cloned antibody (fragment)-presenting cell or antibody (fragment)-presenting ribosome by publicly known methods. The thus obtained monoclonal antibody fragment gene is

recombined with said region of the IgG antibody gene to acquire the monoclonal antibody IgG antibody gene.

The antibody of the present invention can also be obtained by immunizing antibody-producing cells isolated from human or the warm-blooded animals described above with the antigen of the present invention in vitro by publicly known methods and then establishing hybridomas as in the method described in (a).

(c) Manufacturing of monoclonal antibody

The monoclonal antibody of the present invention can be manufactured by culturing the monoclonal antibody-producing hybridoma obtained in (a) and the recombinant cell line in which the antibody gene isolated from the monoclonal antibody-producing hybridoma obtained in (a) by publicly known methods, or the monoclonal antibody gene obtained in (b) is artificially expressed. The monoclonal antibody can also be manufactured by incorporating the antibody gene into a chromosome of warm-blooded animal or plant by publicly known methods, and producing the monoclonal antibody in blood, milk and egg of warm-blooded animals, in plant body, in mold, etc. [Curr. Opin. Biotechnol., 7, 536 (1996), Nature Rev. Genet., 4, 794 (2003), Appl. Environ. Microbiol., 70, 2567 (2004)]. Examples of warm-blooded animals used are bovine, goat, sheep, swine, fowl, mouse, rabbit, etc. Examples of plant bodies are tobacco, sweet corn, potato, duckweed, etc.

The monoclonal antibody of the present invention can be purified from the above-described raw materials containing the monoclonal antibody, for example, by publicly known methods for separation and purification of immunoglobulins [e.g., salting out, alcohol precipitation, isoelectric precipitation, various chromatographies such as ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, reverse phase chromatography, gel filtration chromatography, hydroxyapatite chromatography, affinity chromatography in which only antibody can be separated and purified with a carrier to which a substance having affinity to the antibody such as antigen, protein A, and protein G, etc is immobilized.], and the like.

(3) Medicament comprising the antibody of the present invention

The antibody of the present invention described above can be used as a medicament such as an agent for, for example, preventing/treating cancer (e.g., colon cancer, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, esophageal cancer, gastric cancer, liver cancer, biliary tract carcinoma, spleen cancer, renal cancer, bladder cancer, uterine cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer,

brain tumor, blood tumor, etc.) (preferably, an agent for preventing/treating breast cancer, lung cancer, colon cancer, prostate cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, etc.), an apoptosis inducer of cancer cells, a growth inhibitor of cancer cells, an inducer of cell cycle change in a cancer cell, an agent for suppressing cancer metastasis, a cancer cell adhesion inhibitor, a cytotoxic agent against cancer cells using a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody, an antibody-dependent cytotoxic agent in cancer cells, etc. As the method for damaging cancer cells using a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) by effector cells of living body and complement-dependent cytotoxicity (CDC) are given, and ADCC is preferably used.

The medicament comprising the antibody of the present invention is low toxic, and can be administered orally or parenterally (e.g., intravascular administration, subcutaneous administration, etc.) to human or mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, swine, bovine, cats, dogs, monkeys, etc.) as it is in the form of liquid preparation or as a pharmaceutical composition of appropriate dosage form.

The antibody of the present invention may be administered in itself, or may be administered as an appropriate pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition used for the administration may contain the antibody of the present invention or its salt, a pharmacologically acceptable carrier, and a diluent or excipient. Such a pharmaceutical composition is provided in the dosage form suitable for oral or parenteral administration.

Examples of the composition for parenteral administration are injectable preparations, suppositories, etc. The injectable preparations may include dosage forms such as intravenous, subcutaneous, intracutaneous and intramuscular injections, drip infusions, etc. These injectable preparations may be prepared by methods publicly known. For example, the injectable preparations may be prepared by dissolving, suspending or emulsifying the antibody of the present invention or its salt in a sterile aqueous medium or an oily medium conventionally used for injections. As the aqueous medium for injections, there are, for example, physiological saline, an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents, etc., which may be used in combination with an appropriate solubilizing agent such as an alcohol (e.g., ethanol), a polyalcohol (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol), a nonionic surfactant [e.g., polysorbate 80, HCO-50 (polyoxyethylene (50 mols) adduct of hydrogenated castor oil)], etc. As the oily medium, for example, there are e.g.,

sesame oil, soybean oil, etc., which may be used in combination with a solubilizing agent such as benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. The injectable preparaion thus prepared is usually filled in an appropriate ampoule. The suppository used for rectal administration may be prepared by blending the antibody of the present invention or its salt with conventional bases for suppositories.

The composition for oral administration includes solid or liquid preparations, specifically, tablets (including dragees and film-coated tablets), pills, granules, powdery preparations, capsules (including soft capsules), syrup, emulsions, suspensions, etc. Such a composition is manufactured by publicly known methods and may contain a vehicle, a diluent or excipient conventionally used in the field of pharmaceutical preparations. Examples of the vehicle or excipient for tablets are lactose, starch, sucrose, magnesium stearate, etc.

Favorably, the pharmaceutical compositions for oral or parenteral use described above are prepared into pharmaceutical preparations with a unit dose suited to fit a dose of the active ingredients. Such unit dose preparations include, for example, tablets, pills, capsules, injections (ampoules), suppositories, etc. The amount of the aforesaid compound contained is generally 5 to 500 mg per dosage unit form; it is preferred that the antibody described above is contained in about 5 to about 100 mg especially in the form of injection, and in 10 to 250 mg for the other forms.

The dose of the aforesaid preventive/therapeutic agent or regulator comprising the antibody of the present invention may favorably be an intravenous administration of about 0.01 to about 20 mg/kg body weight, preferably about 0.1 to about 10 mg/kg body weight and more preferably about 0.1 to about 5 mg/kg body weight per administration as the antibody of the present invention, about 1 to 5 times/day, preferably about 1 to 3 times/day, for example when it is used for treating/preventing breast cancer in adult, although the dose may vary depending upon subject to be administered, target disease, conditions, route of administration, etc.. Also in other parenteral and oral administration, the agent can be administered in a dose corresponding to the dose given above. When the condition is especially severe, the dose may be increased according to the condition.

The antibody of the present invention may be administered as it stands or in the form of an appropriate pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition used for the aforesaid administration contains the aforesaid antibody or its salts, a pharmacologically acceptable carrier, and a diluent or excipient. Such a

composition is provided in the dosage form suitable for oral or parenteral administration (e.g., intravascular injection, subcutaneous injection, etc.).

Each composition described above may further contain other active components unless formulation causes any adverse interaction by compounding with the antibody described above.

Furthermore, the antibody of the present invention may be used in combination with other drugs, for example, alkylating agents (e.g., cyclophosphamide, ifosfamide, etc.), metabolic antagonists (e.g., methotrexate, 5-fluorouracil, etc.), antitumor antibiotics (e.g., mitomycin, adriamycin, etc.), plant-derived antitumor agents (e.g., vincristine, vindesine, Taxol, etc.), cisplatin, carboplatin, etoposide, irinotecan, etc. The antibody of the present invention and the drugs described above may be administered simultaneously or at staggered times to the patient.

(4) Quantification of nectin-2 using the antibody of the present invention

The antibody of the present invention is capable of specifically recognizing nectin-2 and therefore can be used for quantification of nectin-2 in a test sample fluid, in particular, for quantification by sandwich immunoassay; etc.

That is, the present invention provides:

(i) a method of quantifying nectin-2 in a test sample fluid, which is characterized by competitively reacting the antibody of the present invention, a test sample fluid and a labeled nectin-2, and measuring the ratio of the labeled nectin-2 bound to said antibody;

(ii) a method of quantifying nectin-2 in a test sample fluid, which is characterized by reacting a test sample fluid with the antibody of the present invention immobilized on a carrier and another labeled antibody of the present invention simultaneously or sequentially, and then measuring the activity of the labeling agent on the insoluble carrier; and,

(iii) a method of quantifying nectin-2 in a test sample fluid, which is characterized by reacting a test sample fluid with the antibody of the present invention immobilized on a carrier, and then measuring the quantitative change of nectin-2 bound to insoluble carrier by e.g., detection method such as surface plasmon resonance (SPR) etc.

In the quantification method (ii) described above, an antibody having different binding sites to nectin-2 is preferably used.

The antibody of the present invention can be used not only for the quantification of nectin-2 but also for the detection of nectin-2 by means of a tissue staining, etc. For these purposes, the antibody molecule per se may be used, and F $(ab')_2$, Fab' or Fab fractions of the antibody molecule may also be used.

The method of quantifying nectin-2 using the antibody of the present invention is not particularly limited. Any quantification method may be used, so long as the level of an antibody, antigen or antibody-antigen complex corresponding to the level of antigen (e.g., the level of protein) in a test sample fluid can be detected by chemical or physical means and the level of the antigen can be calculated from a standard curve prepared from standard solutions containing known levels of the antigen. For such an assay method, for example, nephrometry, the competitive method, the immunometric method, the SPR method, the sandwich method, etc. are suitably used. However, it is particularly preferred to use the sandwich method in terms of sensitivity and specificity described later.

Examples of labeling agents, which are employed for the assay methods using labeling agents, are radioisotopes, enzymes, fluorescent substances, luminescent substances, etc. Examples of radioisotopes include [^{125}I], [^{131}I], [^{3}H], [^{14}C], etc. Preferred examples of the enzymes are those that are stable and have a higher specific activity, which include e.g., β-galactosidase, β-glucosidase, alkaline phosphatase, peroxidase, malate dehydrogenase, etc. Examples of the fluorescent substances include e.g., cyanine fluorescent dyes (e.g., Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 (manufactured by Amersham Biosciences), etc.), fluorescamine, fluorescein isothiocyanate, Alexa Fluor dye (Invitrogen), europium fluorescence complex (Perkin Elmer), etc. Examples of the luminescent substances are e.g., luminol, a luminol derivative, luciferin, lucigenin, etc. Furthermore, a biotin-avidin system may be used for combining an antibody or antigen with a labeling agent.

For immobilization of the antigen or antibody, physical adsorption may be used, and method using chemical binding which is conventionally used for insolubilization or immobilization of proteins, enzymes, etc. may also be used. To immobilize the antigen or antibody, these proteins may be labeled with biotin, which can be bound to a carrier on which streptoavidin (avidin) is previously immobilized. Immobilization of the antibody may be performed by capturing it to a carrier on which protein A, protein G, anti-immunoglobulin antibody, etc. is previously immobilized. For carriers, e.g., insoluble polysaccharides such as agarose, dextran, cellulose, etc.; synthetic resin such as polystyrene, polyacrylamide, silicon, etc., and

glass or the like are used.

In the sandwich method, the immobilized monoclonal antibody of the present invention is reacted with a test sample fluid (primary reaction), then with a labeled form of another monoclonal antibody of the present invention (secondary reaction), and the activity of the label on the immobilizing carrier is measured, whereby the level of the protein of the present invention in the test sample fluid can be quantified. The order of the primary and secondary reactions may be reversed, and the reactions may be performed simultaneously or at staggered times. The methods of labeling and immobilization can be performed by the methods described above. In the immunoassay by the sandwich method, the antibody used for immobilized or labeled antibodies is not necessarily one, but a mixture of two or more of antibodies may be used to increase the assay sensitivity.

In the assay for nectin-2 of the present invention by the sandwich method, the antibodies used in the primary and secondary reactions are preferably antibodies having different binding sites for nectin-2.

The antibodies of the present invention can be used for the assay systems other than the sandwich method, for example, the competitive method, the immunometric method, the SPR method, nephrometry, etc.

In the competitive method, the amount of the antigen in the test sample fluid is quantified by competitively reacting antigen in a test sample fluid and the labeled antigen with antibody, separating the unreacted labeled antigen (F) and the labeled antigen bound to the antibody (B) (B/F separation), followed by measurement of the amount of the label in B or F. This reaction method includes a liquid phase method using a soluble antibody as an antibody, and polyethylene glycol, a secondary antibody against the soluble antibody, etc. for B/F separation, and an solid method either using an immobilized antibody as the primary antibody, or using a soluble antibody as the primary antibody and immobilized antibody as the secondary antibody.

In the immunometric method, the amount of the antigen in the test sample fluid is quantified by competitively reacting antigen in a test sample fluid and immobilized antigen with a definite amount of labeled antibody, followed by separation of the immobilized phase from the liquid phase, or by reacting antigen in a test sample fluid and an excess amount of labeled antibody, adding immobilized antigen to capture the unreacted labeled antibody, followed by separation of the immobilized phase from the liquid phase, both of which were followed by

61

measurement of the amount of the label in either phase.

In the SPR method, the antibody is insolubilized on the surface of a gold thin film formed on a glass substrate, and a test sample fluid is applied onto the thin film. A change in quantity of the protein analyte bound to the antibody on the thin layer is quantified using the principle of surface plasmon resonance (SPR) (Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 37, 2977-2984 (1992)).

And in the nephrometry, the insoluble precipitate produced after the antigen-antibody reaction in gel or solution is quantified. When the amount of antigen in the test sample fluid is small and only a small amount of the precipitate is obtained, laser nephrometry using laser scattering is favorably employed.

For applying each of these immunological assays to the quantification method of the present invention, it is not required to set forth any particular conditions, procedures, etc. Quantification system for nectin-2 is established by adding conventional technical consideration in the art to the conventional conditions, procedures, etc. For details of these general technical means, the following reviews and texts may be refered.

For example, Hiroshi Irie, ed. "Radioimmunoassay" (Kodansha, published in 1974), Hiroshi Irie, ed. "Sequel to the Radioimmunoassay" (Kodansha, published in 1979), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Enzyme immunoassay" (Igakushoin, published in 1978), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Enzyme immunoassay" (2nd ed.) (Igakushoin, published in 1982), Eiji Ishikawa, et al. ed. " Enzyme immunoassay " (3rd ed.) (Igakushoin, published in 1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A)), ibid., Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), ibid., Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), ibid., Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), ibid., Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), ibid., Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(all published by Academic Press Publishing), etc. may be referred.

As described above, nectin-2 can be quantified with high sensitivity, using the antibody of the present invention.

(5) Diagnostic agent and diagnostic method using the antibody of the present invention

Furthermore, when an increased level of nectin-2 is detected by quantifying

the level of nectin-2 using the antibody of the present invention, it can be diagnosed that one suffers from diseases, for example, cancer (e.g., colon cancer, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, esophageal cancer, gastric cancer, liver cancer, biliary tract cancer, spleen cancer, renal cancer, bladder cancer, uterine cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer, brain tumor, blood tumor, etc.) or the like, or it is highly likely that one would suffer from these diseases in the future.

Besides, the antibody of the present invention may be used for detecting nectin-2 present in test samples such as body fluids, tissues, etc. The antibody may also be used for preparation of antibody columns used to purify nectin-2, for detection of nectin-2 in each fraction upon purification, for analysis of the behavior of nectin-2 in test cells; etc.

(6) Antibody used in the agent of the invention for preventing/treating breast cancer

A monoclonal antibody (hereinafter reffered to as the antibody used in the present invention) produced by hybridoma cell shown by:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),
Nec1-244-3 (FERM BP-10423),
Nec1-530-1 (FERM BP-10424),
Nec1-903-1 (FERM BP-10425),
Nec1-520-1 (FERM BP-10426),
Nec1-845-2 (FERM BP-10427),
Nec1-834-1 (FERM BP-10428),
Nec1-964-1 (FERM BP-10683),
Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),
Nec1-554-1 (FERM BP-10681),
Nec1-769-2 (FERM BP-10682), or
Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) can be used.

The antibody used in the present invention further includes antibodies (including antibody fragments) produced by genetic engineering and having specific CDR amino acid sequences or amino acid sequences in the variable region of the antibodies produced by these hybridomas.

At the N-terminal sides of the heavy and light chains, there are variable

regions which are called a heavy chain variable region (VH) and a light chain variable region (VL), respectively. In the variable region, there is a complementarity determining region (CDR) and this part is responsible for the specificity of antigen recognition. A part of the variable region other than CDR functions to retain the structure of CDR and is called a framework region (FR). At the C-terminal sides of the heavy and light chains, there are constant regions which are called a heavy chain constant region (CH) and a light chain constant region (CL), respectively. In the heavy chain variable region, there are three complementarity determining regions: the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2), and the third complementarity determining region (CDR3). The three complementarity determining regions in the heavy chain variable region are collectively called a heavy chain complementarity determining region. Likewise, there are three complementarity determining regions in the light chain variable region, which are the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2), and the third complementarity determining region (CDR3). These three complementarity determining regions in the light chain variable region are collectively called a light chain complementarity determining region.

CDR Sequence (amino acid sequence and base sequence) of the antibody used in the present invention are shown in the following TABLEs 21-24.

The amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively.

The amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) the sequence identification number selected from the group

consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively.

As for the antibody used in the present invention, amino acid sequences other than CDR are not particularly limited but the antibody of the present invention includes a so-called CDR grafted antibody in which amino acid sequences other than CDR are derived from another antibody, especially from an antibody of different species. Human-derived amino acid sequences are preferred as the amino acid sequences other than CDR and may be accompanied, if necessary, by the addition, deletion, substitution and/or insertion of one or more amino acid residues in the framework region (FR).

As for the antibody used in the present invention, the amino acid sequence and base sequence in the variable regions of the antibody of the present invention are preferably those given in TABLE 25. The monoclonal antibody comprising a specific CDR amino acid sequence or variable region amino acid sequence of the antibody used in the present invention can be prepared using known methods.

(7) Monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with the antibody of the present invention used as the agent for preventing/treating breast cancer:

The monoclonal antibody which can be used includes the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),
Nec1-244-3 (FERM BP-10423),
Nec1-530-1 (FERM BP-10424),
Nec1-903-1 (FERM BP-10425),
Nec1-520-1 (FERM BP-10426),
Nec1-845-2 (FERM BP-10427),
Nec1-834-1 (FERM BP-10428),
Nec1-964-1 (FERM BP-10683),
Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),
Nec1-554-1 (FERM BP-10681),
Nec1-769-2 (FERM BP-10682), or,
Nec8-4116-8 (FERM BP-10685)

or the monoclonal antibody, which binds to nectin-2 competitively with the antibodies (including antibody fragments) having specific CDR amino acid sequences or amino acid sequences in the variable region of the antibodies produced by these hybridomas (hereinafter also referred to as the antibody binding competitively with the antibody used in the present invention).

(7)-(i) Preparation of antigen

As the antigen used to prepare the antibody competitively binding to the antigen with the antibody used in the present invention, for example, a cell line or its membrane fraction wherein any one of the antigens such as a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 (nectin-2), its partial peptide, or salts thereof, is highly expressed naturally or artificially; a fusion protein of the extracellular domain protein of nectin-2 and the other protein or peptide, or salts thereof; a (synthetic) peptide having one or more antigenic determinants, which are the same as in nectin-2; an animal cell expression vector comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4, or a part of the nucleotide sequence thereof, etc. can be used (hereinafter these antigens are sometimes merely referred to as the antigen used in the present invention).

Examples of the "other protein or peptide" to produce the fusion protein with extracellular domain of nectin-2 include FLAG-tag, His-tag, Myc-tag, V5-tag, GST-tag, S-tag, T7-tag, or the Fc regions of human antibody, mouse antibody, etc., and so on.

Although the length of a peptide having the same antigenic determinant as nectin-2 used to produce an antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention is not limited so long as it has such a length as exhibiting immunogenicity, the peptide includes, for example, a peptide having, e.g., 6, preferably 10 and more preferably 12 consecutive amino acid residues.

A peptide having the sequence of at least 20, preferably at least 50, more preferably at least 70, still more preferably at least 100 and most preferably at least 200 amino acids in the constituent amino acid sequence of nectin-2, and the like are used as the protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, or its partial peptide, which is used to produce the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention.

Also, the antigenic determinant of the antibody used in the present invention is described in PCT/JP2006/320429, based on which the present application was

66.

filed. The description of PCT/JP2006/320429 is also incorporated in the present invention by reference.

Nectin-2 or its partial peptides, or salts thereof may be manufactured by publicly known methods or their modifications used to purify proteins from human or warm-blooded animal cells or tissues described above. Alternatively, they may also be manufactured by culturing transformants bearing DNAs encoding these proteins. And, they may also be manufactured according to a modification of the methods for peptide synthesis described later described. In addition, a fusion protein of the extracellular domain of nectin-2 and the other protein or peptide may also be manufactured by culturing transformants bearing DNAs encoding the fusion protein.

(7)-(ii) Production of monoclonal antibody

(a) Production of monoclonal antibody-producing cells by the hybridoma method

The antigen described in (2)-(i) is administered to warm-blooded animals. Immunization may be done by any method, as long as it can stimulate antibody production, and preferably used are intravenous injection, intraperitoneal injection, intramuscular injection, subcutaneous injection, intradermal injection, footpad injection, etc. The antigen used in the present invention may directly be used for immunization in its insolublized form. Alternatively, the antigen may be bound or adsorbed to an appropriate carrier and the resulting conjugate may be used for immunization.

When the antigen used in the present invention is administered, in order to potentiate the antibody productivity of an immununized animal, the antigen used in the present invention may be mixed with an adjuvant such as complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant, alum, a Ribi adjuvant, etc. and the resulting mixture or emulsion may be administered to the animal. Examples of warm-blooded animals used are monkeys, rabbits, dogs, guinea pigs, mice, rats, hamster, sheep, goats, camels, llamas and fowl, with the use of mice and rats being preferred. These warm-blooded animals may be KO animals wherein the warm-blooded animal ortholog genes of antigen proteins are knockout to achieve a more potent immune response against the antigen. Also, transgenic animals wherein antibody genes of warm-blooded animals are knockout and human antibody genes are introduced (see European Patent Application EPA 0546073), knock-in animals (WO 02/098217, WO 03/020743), etc. may be used to produce human monoclonal antibodies.

In producing the monoclonal antibody-producing cells, a warm-blooded animal, e.g., a mouse, wherein the antibody titer is observed is selected from animals immunized with the antigen, then spleen or lymph node is collected 2 to 5 days after the final immunization. The antibody-producing B cells contained therein are fused with myeloma cells derived from the same or different species, whereby hybridomas producing the monoclonal antibody can be produced. Examples of the myeloma cells are those collected from warm-blooded animals such as NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1, etc. In particular, SP2/0 and P3U1 are preferably employed. Screening of hybridomas can be performed by publicly known methods or their modifications.

(b) Production of monoclonal antibody by other methods

The method for producing the antibody is not limited to the methods described above, but a so-called antibody display technology, which involves presenting an antibody gene library prepared by publicly known methods using B lymphocytes of, e.g., human or warm-blooded animal (e.g., monkey, rabbit, dog, guinea pig, mouse, rat, hamster, sheep, goat, camel, llama, fowl, etc.) as a material on the cell surface of bacteriophage, Escherichia coli, yeast, animal cells, etc. or on ribosome [Nature Biotechnology: 23, 1105 (2005)] can be used. Human or warm-blooded animals may be naive ones, patients carrying cancer which overexpresses the antigen used in the present invention, or warm-blooded animals which are immunized with the antigen used in the present invention by the method described in (a). The form of antibodies presented on the cell surface includes, but not limited to, IgG molecules, IgM molecules, Fab fragments, single chain Fv (scFv) fragments, etc.

The gene for the monoclonal antibody (fragment) capable of specifically binding to the antigen used in the present invention can be produced as follows. The aforesaid antibody (fragment)-presenting cell or antibody (fragment)-presenting ribosome carrying an antibody gene library is reacted with the antigen used in the present invention for a given period of time, followed by removing non-specifically bound substances by washing. After eluting and recovering the product bound specifically to the antigen used in the present invention, the antibody (fragment)-presenting cell or antibody (fragment)-presenting ribosome is allowed to grow. The same procedure is repeated several times, and finally the aimed gene can be isolated from the cloned antibody (fragment)-presenting cell or antibody (fragment)-presenting ribosome by publicly known methods. The thus obtained monoclonal antibody fragment gene is recombined with said region of the IgG

antibody gene by publicly known methods to obtain the monoclonal antibody IgG antibody gene.

The monoclonal antibody comprising substantially the same amino acid sequence as a specific CDR amino acid sequence or a variable region amino acid sequence of the antibody used in the present invention can also be obtained by genetic engineering.

Herein, the aforesaid amino acid sequence which is substantially the same as a specific CDR amino acid sequence or a variable region amino acid sequence (hereinafter amino acid sequence A) of the monoclonal antibody used in the present invention includes amino acid sequences having at least about 50% homology, preferably at least about 60% homology, more preferably at least about 70% homology, still more preferably at least about 80% homology, much more preferably at least about 90% homology and most preferably at least about 95% homology, to the amino acid sequence A; etc.

Homology of the amino acid sequences can be measured using a homology scoring algorithm NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) under the following conditions (an expectation value = 10; gaps are allowed; matrix = BLOSUM62; filtering = OFF).

Examples of the monoclonal antibody comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence A include antibody containing (i) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are deleted of the amino acid sequence A; (ii) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are added to the amino acid sequence A; (iii) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids are inserted into the amino acid sequence A; (iv) an amino acid sequence wherein at least 1 or 2 (e.g., about 1 to about 50, preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 to 5)) amino acids in the amino acid sequence A are substituted by other amino acids; or (v) an amino acid sequence which are in combination of abovementhions; and the like.

The antibody used in the present invention can also be obtained by immunizing antibody-producing cells isolated from human or the warm-blooded

animals described above with the antigen used in the present invention in vitro by publicly known methods and then producing hybridomas.

The monoclonal antibody used in the present invention can be manufactured by culturing the monoclonal antibody-producing hybridoma obtained in (a) and the recombinant cell line in which the antibody gene isolated from the monoclonal antibody-producing hybridoma obtained in (a) by publicly known methods, or the monoclonal antibody gene obtained in (b) is artificially expressed. The monoclonal antibody can also be manufactured by incorporating the antibody gene into a chromosome of warm-blooded animal or plant by publicly known methods, and producing the monoclonal antibody in blood, milk and egg of warm-blooded animals, in plant body, in mold, etc. [Curr. Opin. Biotechnol., 7, 536 (1996), Nature Rev. Genet., 4, 794 (2003), Appl. Environ. Microbiol., 70, 2567 (2004)]. Examples of warm-blooded animals used are bovine, goat, sheep, swine, fowl, mouse, rabbit, etc. Examples of plant bodies are tobacco, sweet corn, potato, duckweed, etc.

Various methods can be used for screening of the monoclonal antibody-producing hybridomas. Examples of such methods include a method which involves adding the culture supernatant of a hybridoma to a solid phase (e.g., microplate) adsorbed with a soluble protein antigen or protein antigen-expressing cell, directly or together with a carrier, followed by the reaction with an anti-immunoglobulin antibody (for example, when spleen cells used for the cell fusion are from mouse, an anti-mouse immunoglobulin antibody is used) labeled with a radioactive substance, an enzyme, a fluorescent substance, etc., or with Protein A, and detecting the monoclonal antibody bound to the solid phase; a method which involves adding the hybridoma supernatant to a solid phase adsorbed with an anti-immunoglobulin antibody or Protein A, followed by the reaction with a soluble protein antigen labeled with a radioactive substance, an enzyme, or a fluorescent substance, etc. and detecting the antigen-specific monoclonal antibody bound to the solid phase; etc. When the protein antigen-expressing cell is used, the hybridoma culture supernatant is added to the cell, followed by the reaction with a fluorescence-labeled anti-immunoglobulin antibody, and the fluorescence intensity of the cell is assayed on a fluorescence detector such as a flow cytometer, etc. Thus, the monoclonal antibody bound to the protein antigen on the cell membrane can be detected.

The monoclonal antibody used in the present invention can be purified from the above-described raw materials containing the monoclonal antibody, for example,

by publicly known methods for separation and purification of immunoglobulins [e.g., salting out, alcohol precipitation, isoelectric precipitation, various chromatographies such as ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, reverse phase chromatography, gel filtration chromatography, hydroxyapatite chromatography, affinity chromatography in which only antibody can be separated and purified with a carrier to which a substance having affinity to the antibody such as antigen, protein A, and protein G, etc is immobilized.], and the like.

(7)-(iii) Screening of antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used as the agent of this invention for preventing/treating breast cancer

The antibody which binds competitively with the antibody used in the present invention can be obtained by screening in an assay to determine if the antibody binds to nectin-2 competitively with the antibody used in the present invention.

The "nectin-2" used for the screening is the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (hereinafter briefly referred to as nectin-2α) or the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 (hereinafter briefly referred to as nectin-2δ) (hereinafter both nectins are sometimes collectively referred to as nectin-2 or the protein used in the present invention). The nectin-2 may be proteins derived from human or warm-blooded animal cells or tissues, or recombinant proteins. They may also be peptides shown by a partial sequence of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3. Examples of the nectin-2, which can be used, are a peptide shown by the 1st-350th (extracellular domain) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ), a peptide shown by the 47th-142nd (the first IG-like domain) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ), or a peptide shown by the 175th-240th (the second IG-like domain) amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (nectin-2α) or SEQ ID NO: 3 (nectin-2δ) and the like. Nectin-2 further includes peptides wherein the C-terminal carboxyl group is esterified or amidated, those wherein the amino group at the N-terminal amino acid residue (e.g., methionine residue) is protected with a protecting group, those wherein the N-terminal region is cleaved *in vivo* and the glutamyl residue thus formed is pyroglutamated; those wherein a substituent on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group, or conjugated peptides such as glycopeptides bound to sugar chains, etc. These peptides may be

in the form of salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids, organic acids) or bases (e.g., alkaline metal salts), etc.

As used herein, the term "antibody binding competitively" refers to an antibody, which binding to nectin-2 is competitively inhibited by adding an excess of any one of the antibodies used in the present invention. Specifically, the antibody refers to, for example, an antibody showing at least 50% inhibition against the binding of a test antibody to nectin-2, when 50-fold molar amount of any one of the antibodies used in the present invention is added to said antibody under test.

As used herein, the antibody used in the present invention includes a chimeric antibody, a humanized antibody and a human antibody. The "chimeric antibody" means an antibody which has the variable regions derived from an antibody of different species and constant regions of human antibody (see, e.g., EP 0125023, etc.). The "humanized antibody" refers to an antibody designed to modify a human-heterologous antibody like a mouse antibody, by replacing its primary structure other than the complementarity determining regions of H and L chains with the corresponding primary structure of a human antibody. The "human antibody" refers to a monoclonal antibody prepared using a transgenic animal carrying human antibody genes (see EP 0546073) and a monoclonal antibody prepared using a library in which a human antibody gene is presented on the cell surface of bacteriophage, Escherichia coli, yeast, animal cells, etc., a so-called antibody display technology (Nature Biotechnology, 23, 1105 (2005)), and a monoclonal antibody isolated from human B cells producing an antibody against nectin-2 using cell fusion, phage display, or the like. The antibody used in the present invention is preferably a monoclonal antibody with the constant regions of the antibody belonging to a human antibody, more preferably human IgG, and most preferably human IgG_1 subclass.

(8) Agent for preventing/treating breast cancer of the present invention

The medicament comprising the aforesaid antibody used in the present invention or the antibody binding to nectin-2 competitively with the antibody used in the present invention can be used as an agent for preventing/treating breast cancer, an agent for preventing or treating breast cancer using a host defense mechanism mediated by the Fc region of the antibody, an antibody-dependent cytotoxic agent against breast cancer cells, etc. The method for damaging breast cancer cells using a host defense mechanism mediated by the Fc region of the antibody includes antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by effector cells of living body and complement-dependent cytotoxicity (CDC), and ADCC is preferably used.

The antibody used in the present invention or the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention is low toxic, and can be administered orally or parenterally (e.g., intravascular administration, subcutaneous administration, etc.) to human or mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, swine, bovine, cats, dogs, monkeys, etc.) as it is in the form of liquid preparation or as a pharmaceutical composition of appropriate dosage form.

The antibody used in the present invention or the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention may be administered directly, or may be administered as an appropriate pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition used for the administration may contain the antibody used in the present invention and its salt, a pharmacologically acceptable carrier, and a diluent or excipient. Such a pharmaceutical composition is provided in the dosage form suitable for oral or parenteral administration.

Examples of the composition for parenteral administration are injectable preparations, suppositories, etc. The injectable preparations may include dosage forms such as intravenous, subcutaneous, intracutaneous and intramuscular injections, drip infusions, etc. These injectable preparations may be prepared by methods publicly known. The injectable preparations may be prepared, for example, by dissolving, suspending or emulsifying the antibody of the present invention or its salt in a sterile aqueous medium or an oily medium conventionally used for injections. As the aqueous medium for injections, there are used, for example, physiological saline, an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents, etc., which may be used in combination with an appropriate solubilizing agent such as an alcohol (e.g., ethanol), a polyalcohol (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol), a nonionic surfactant [e.g., polysorbate 80, HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)], etc. As the oily medium, for example, there are e.g., sesame oil, soybean oil, etc., which may be used in combination with a solubilizing agent such as benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. The injectable preparation thus prepared is usually filled in an appropriate ampoule. The suppository used for rectal administration may be prepared by blending the antibody of the present invention or its salt with conventional bases for suppositories.

The composition for oral administration includes solid or liquid dosage forms, specifically, tablets (including dragees and film-coated tablets), pills, granules, powdery preparations, capsules (including soft capsules), syrup, emulsions, suspensions, etc. Such a composition is manufactured by publicly known methods

and may contain a vehicle, a diluent or excipient conventionally used in the field of pharmaceutical preparations. Examples of the vehicle or excipient for tablets are lactose, starch, sucrose, magnesium stearate, etc.

Advantageously, the pharmaceutical compositions for oral or parenteral use described above are prepared into pharmaceutical preparations with a unit dosage form suitable for a dose of the active ingredients. Such unit dosage forms include, for example, tablets, pills, capsules, injections (ampoules), suppositories, etc. The amount of the antibody used in the present invention or the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention contained is generally 5 to 500 mg per dosage unit form; it is preferred that the antibody described above is contained in about 5 to about 100 mg especially in the form of injection, and in 10 to 250 mg for the other dosage forms.

The dose of the aforesaid preventive/therapeutic agent or regulator comprising the antibody used in the present invention or the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention may vary depending upon subject to be administered, target disease, conditions, route of administration, etc. but the agent or regulator may advantageously be administered intravenously in a single dose of about 0.01 to about 20 mg/kg body weight, preferably about 0.1 to about 10 mg/kg body weight and more preferably about 0.1 to about 5 mg/kg body weight per administration as the antibody of the present invention, about 1 to 5 times/day, preferably about 1 to 3 times/day when it is used for treating/preventing, for example, breast cancer in adult. Also in other parenteral and oral administration, the agent or regulator can be administered in a dose corresponding to the dose given above. When the condition is especially severe, the dose may be increased according to the condition.

The antibody used in the present invention or the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention may be administered as it stands or in the form of an appropriate pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition used for the aforesaid administration contains the aforesaid antibody or its salts, a pharmacologically acceptable carrier, and a diluent or excipient. Such a composition is provided in the dosage form suitable for oral or parenteral administration (e.g., intravascular injection, subcutaneous injection, etc.).

Each composition described above may further contain other active components unless formulation causes any adverse interaction by formulating with the antibody described above.

f4

Furthermore, the antibody used in the present invention or the antibody competitively binding to nectin-2 with the antibody used in the present invention may be used in combination with other drugs, for example, alkylating agents (e.g., cyclophosphamide, ifosfamide, etc.), metabolic antagonists (e.g., methotrexate, 5-fluorouracil, gemcitabine, etc.), antitumor antibiotics (e.g., mitomycin, adriamycin, etc.), plant-derived antitumor agents (e.g., vincristine, vindesine, paclitaxel, docetaxel, etc.), hormone therapeutic agents (e.g., tamoxifen, anastrozole, letrozole, etc.), platinum preparations (e.g., cisplatin, carboplatin, etc.), molecular targeting agents (e.g., herceptin, gefitinib and imatinib, etc.), etoposide, irinotecan, etc. The antibody used in the present invention and the drugs described above may be administered simultaneously or at staggered times to the patient.

(9) This invention further includes the following features.

That is, the present invention is further directed to the hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807); the monoclonal antibody produced from the hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807); the monoclonal antibody binding competitively with the monoclonal antibody produced from the hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807); and the agent for preventing or treating breast cancer comprising these monoclonal antibodies.

These features can be implemented as in the embodiments (6) to (8) described above.

Hybridoma Nec1-1044-4 has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10805 since April 3, 2007.

Hybridoma Nec8-3517-11 has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10806 since April 3, 2007.

Hybridoma Nec8-3704-7 has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code:

305-8566) under Accession Number FERM BP-10807 since April 3, 2007.

In the specification and drawings, where bases, amino acids, etc. are denoted by their abbreviations, they are based on conventional codes in accordance with the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature or by the common codes in the art, examples of which are shown below. For amino acids that may have the optical isomer, L form is presented unless otherwise indicated.

DNA : deoxyribonucleic acid
cDNA : complementary deoxyribonucleic acid
A : adenine
T : thymine
G : guanine
C : cytosine
RNA : ribonucleic acid
mRNA : messenger ribonucleic acid
dATP : deoxyadenosine triphosphate
dTTP : deoxythymidine triphosphate
dGTP : deoxyguanosine triphosphate
dCTP : deoxycytidine triphosphate
ATP : adenosine triphosphate
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
SDS : sodium dodecyl sulfate
Gly : glycine
Ala : alanine
Val : valine
Leu : leucine
Ile : isoleucine
Ser : serine
Thr : threonine
Cys : cysteine
Met : methionine
Glu : glutamic acid
Asp : aspartic acid
Lys : lysine
Arg : arginine

His : histidine
Phe : phenylalanine
Tyr : tyrosine
Trp : tryptophan
Pro : proline
Asn : asparagine
Gln : glutamine
pGlu : pyroglutamic acid
Sec : selenocysteine

The sequence identification numbers in the sequence listing of the specification indicate the following sequences.

[SEQ ID NO: 1]

This shows the amino acid sequence of nectin-2α.

[SEQ ID NO: 2]

This shows the base sequence of DNA encoding nectin-2α having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[SEQ ID NO: 3]

This shows the amino acid sequence of nectin-2δ.

[SEQ ID NO: 4]

This shows the base sequence of DNA encoding nectin-2δ having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3.

[SEQ ID NO: 5]

This shows the amino acid sequence of nectin-3.

[SEQ ID NO: 6]

This shows the base sequence of DNA encoding nectin-3 having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.

[SEQ ID NO: 7]

This shows the base sequence of the antisense oligonucleotide 1 used in REFERENCE EXAMPLES 1 and 2.

[SEQ ID NO: 8]

This shows the base sequence of the control oligonucleotide 1 used in REFERENCE EXAMPLES 1 and 2.

[SEQ ID NO: 9]

This shows the base sequence of primer 1 used in REFERENCE EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO: 10]

This shows the base sequence of primer 2 used in REFERENCE EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO: 11]

This shows the base sequence of TaqMan probe 1 used in REFERENCE EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO: 12]

This shows the base sequence of primer 3 used in REFERENCE EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO: 13]

This shows the base sequence of primer 4 used in REFERENCE EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO: 14]

This shows the base sequence of TaqMan probe 2 used in REFERENCE EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO: 15]

This shows the base sequence of primer 5 used in REFERENCE EXAMPLES 3 and 4.

[SEQ ID NO: 16]

This shows the base sequence of primer 6 used in REFERENCE EXAMPLE 3.

[SEQ ID NO: 17]

This shows the base sequence of primer 7 used in REFERENCE EXAMPLE 4.

[SEQ ID NO: 18]

This shows the base sequence of primer 8 used in REFERENCE EXAMPLE 5.

[SEQ ID NO: 19]

This shows the base sequence of siRNA-1 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 20]

This shows the base sequence of siRNA-1 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 21]

This shows the base sequence of siRNA-2 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 22]

This shows the base sequence of siRNA-2 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 23]

This shows the base sequence of siRNA-3 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 24]

This shows the base sequence of siRNA-3 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 25]

This shows the base sequence of siRNA-4 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 26]

This shows the base sequence of siRNA-4 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 27]

This shows the base sequence of siRNA-5 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 28]

This shows the base sequence of siRNA-5 used in REFERENCE EXAMPLES 5, 6 and 7.

[SEQ ID NO: 29]

This shows the base sequence of primer 33 used in REFERENCE EXAMPLE12.

[SEQ ID NO: 30]

This shows the base sequence of primer 34 used in REFERENCE EXAMPLE 12.

[SEQ ID NO: 31]

This shows the amino acid sequence of nectin-2ED-FLAG protein.

[SEQ ID NO: 32]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-2ED-FLAG protein represented by SEQ ID NO: 31.

[SEQ ID NO: 33]

This shows the base sequence of primer 33 used in REFERENCE EXAMPLE 15.

[SEQ ID NO: 34]

This shows the base sequence of primer 34 used in REFERENCE EXAMPLE 15.

[SEQ ID NO: 35]

This shows the base sequence of primer 35 used in REFERENCE EXAMPLE 15.

[SEQ ID NO: 36]

This shows the base sequence of primer 36 used in REFERENCE EXAMPLE 15.

[SEQ ID NO: 37]

This shows the amino acid sequence of nectin-2ED-hFc protein.

[SEQ ID NO: 38]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-2ED-FLAG protein represented by SEQ ID NO: 37.

[SEQ ID NO: 39]

This shows the amino acid sequence of the peptide 1 used in REFERENCE EXAMPLE 17.

[SEQ ID NO: 40]

This shows the amino acid sequence of the peptide 2 used in REFERENCE EXAMPLE 17.

[SEQ ID NO: 41]

This shows the amino acid sequence of the peptide 3 used in REFERENCE EXAMPLE 17.

[SEQ ID NO: 42]

This shows the base sequence of primer 42 used in REFERENCE EXAMPLES 18 and 19.

[SEQ ID NO: 43]

This shows the base sequence of primer 43 used in REFERENCE EXAMPLES 18 and 19.

[SEQ ID NO: 44]

This shows the base sequence of TaqMan probe 3 used in REFERENCE EXAMPLES 18 and 19.

[SEQ ID NO: 45]

This shows the base sequence of primer 45 used in REFERENCE EXAMPLE 21.

[SEQ ID NO: 46]

This shows the base sequence of primer 46 used in REFERENCE EXAMPLE 21.

[SEQ ID NO: 47]

This shows the base sequence of primer 47 used in REFERENCE EXAMPLE 21.

[SEQ ID NO: 48]

This shows the base sequence of primer 48 used in REFERENCE EXAMPLE 21.

[SEQ ID NO: 49]

This shows the amino acid sequence of nectin-3ED-hFc protein.

[SEQ ID NO: 50]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-3ED-hFc protein represented by SEQ ID NO: 49.

[SEQ ID NO: 51]

This shows the amino acid sequence of nectin-3ED-mFc protein.

[SEQ ID NO: 52]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-3ED-mFc protein represented by SEQ ID NO: 51.

[SEQ ID NO: 53]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of FLAG protein (FLAG-FSALNOT) used in REFERENCE EXAMPLE 25.

[SEQ ID NO: 54]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of FLAG protein (FLAG-RSALNOT) used in REFERENCE EXAMPLE 25.

[SEQ ID NO: 55]

This shows the base sequence of primer 55 used in REFERENCE EXAMPLE 25.

[SEQ ID NO: 56]

This shows the base sequence of primer 56 used in REFERENCE EXAMPLE 25.

[SEQ ID NO: 57]

This shows the amino acid sequence of nectin-3ED-FLAG protein.

[SEQ ID NO: 58]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-3ED-FLAG protein.

[SEQ ID NO: 59]

This shows the base sequence of primer 59 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 60]

This shows the base sequence of primer 60 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 61]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-1 protein.

[SEQ ID NO: 62]

This shows the amino acid sequence of nectin-1 protein.

[SEQ ID NO: 63]

This shows the base sequence of primer 63 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 64]

This shows the base sequence of primer 64 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 65]

This shows the base sequence of primer 65 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 66]

This shows the base sequence of primer 66 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 67]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of nectin-4 protein.

[SEQ ID NO: 68]

This shows the amino acid sequence of nectin-4 protein.

[SEQ ID NO: 69]

This shows the base sequence of primer 69 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 70]

This shows the base sequence of primer 70 used in REFERENCE EXAMPLE 29.

[SEQ ID NO: 71]

This shows the amino acid sequence of Necl-5 protein.

[SEQ ID NO: 72]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of Necl-5 protein.

[SEQ ID NO: 73]

This shows the base sequence of primer 73 used in REFERENCE EXAMPLE 30.

[SEQ ID NO: 74]

This shows the base sequence of primer 74 used in REFERENCE EXAMPLE 30.

[SEQ ID NO: 75]

This shows the base sequence of primer 75 used in REFERENCE EXAMPLE 30.

[SEQ ID NO: 76]

This shows the base sequence of primer 76 used in REFERENCE EXAMPLE 30.

[SEQ ID NO: 77]

This shows the base sequence of primer 77 used in REFERENCE EXAMPLE 30.

[SEQ ID NO: 78]

This shows the amino acid sequence of Ig1 domain-deficient protein in nectin-2.

[SEQ ID NO: 79]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of Ig1 domain-deficient protein in nectin-2.

[SEQ ID NO: 80]

This shows the amino acid sequence of Ig2 domain-deficient protein in nectin-2.

[SEQ ID NO: 81]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of Ig2 domain-deficient protein in nectin-2.

[SEQ ID NO: 82]

This shows the base sequence of primer 82 used in REFERENCE EXAMPLE 31.

[SEQ ID NO: 83]

This shows the base sequence of primer 83 used in REFERENCE EXAMPLE 31.

[SEQ ID NO: 84]

This shows the base sequence of primer 84 used in REFERENCE EXAMPLE 31.

[SEQ ID NO: 85]

This shows the base sequence of primer 85 used in REFERENCE EXAMPLE 31.

[SEQ ID NO: 86]

This shows the amino acid sequence of cynomolgus monkey nectin-2 protein.

[SEQ ID NO: 87]

This shows the base sequence of DNA encoding the amino acid sequence of cynomolgus monkey nectin-2 protein.

[SEQ ID NO: 88]

This shows the base sequence of primer 88 used in REFERENCE EXAMPLE 32.

[SEQ ID NO: 89]

This shows the base sequence of primer 89 used in REFERENCE EXAMPLE 32.

[SEQ ID NO: 90]

This shows the base sequence of primer 90 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 91]

This shows the base sequence of primer 91 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 92]

This shows the base sequence of primer 92 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 93]

This shows the base sequence of primer 93 used in REFERENCE

EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 94]

This shows the base sequence of primer 94 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 95]

This shows the base sequence of primer 95 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 96]

This shows the base sequence of primer 96 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 97]

This shows the base sequence of primer 97 used in REFERENCE EXAMPLE 33.

[SEQ ID NO: 98]

This shows the base sequence of primer Q37A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 99]

This shows the base sequence of primer Q37A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 100]

This shows the base sequence of primer P40G used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 101]

This shows the base sequence of primer P40G R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 102]

This shows the base sequence of primer Q45A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 103]

This shows the base sequence of primer Q45A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 104]

This shows the base sequence of primer H55A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 105]

This shows the base sequence of primer H55A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 106]

This shows the base sequence of primer V60A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 107]

This shows the base sequence of primer V60A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 108]

This shows the base sequence of primer Y64A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 109]

This shows the base sequence of primer Y64A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 110]

This shows the base sequence of primer Q71A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 111]

This shows the base sequence of primer Q71A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 112]

This shows the base sequence of primer A75G used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 113]

This shows the base sequence of primer A75G R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 114]

This shows the base sequence of primer P76G used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 115]

This shows the base sequence of primer P76G R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 116]

This shows the base sequence of primer A77G used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 117]

This shows the base sequence of primer A77G R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 118]

This shows the base sequence of primer N78A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 119]

This shows the base sequence of primer N78A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 120]

This shows the base sequence of primer H79A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 121]

This shows the base sequence of primer H79A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 122]

This shows the base sequence of primer Q80A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 123]

This shows the base sequence of primer Q80A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 124]

This shows the base sequence of primer N81A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 125]

This shows the base sequence of primer N81A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 126]

This shows the base sequence of primer K88A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 127]

This shows the base sequence of primer K88A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 128]

This shows the base sequence of primer S95A used in REFERENCE

EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 129]

This shows the base sequence of primer S95A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 130]

This shows the base sequence of primer K109A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 131]

This shows the base sequence of primer K109A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 132]

This shows the base sequence of primer E117A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 133]

This shows the base sequence of primer E117A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 134]

This shows the base sequence of primer D122A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 135]

This shows the base sequence of primer D122A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 136]

This shows the base sequence of primer H128A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 137]

This shows the base sequence of primer H128A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 138]

This shows the base sequence of primer N137A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 139]

This shows the base sequence of primer N137A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 140]

This shows the base sequence of primer F145A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 141]

This shows the base sequence of primer F145A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 142]

This shows the base sequence of primer K147A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 143]

This shows the base sequence of primer K147A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 144]

This shows the base sequence of primer V150A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 145]

This shows the base sequence of primer V150A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 146]

This shows the base sequence of primer M153A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 147]

This shows the base sequence of primer M153A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 148]

This shows the base sequence of primer T154A used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 149]

This shows the base sequence of primer T154A R used in REFERENCE EXAMPLE 34.

[SEQ ID NO: 150]

This shows the base sequence of primer Q165A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 151]

This shows the base sequence of primer Q165A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 152]

This shows the base sequence of primer K170A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 153]

This shows the base sequence of primer K170A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 154]

This shows the base sequence of primer F173A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 155]

This shows the base sequence of primer F173A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 156]

This shows the base sequence of primer P177G used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 157]

This shows the base sequence of primer P177G R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 158]

This shows the base sequence of primer I184A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 159]

This shows the base sequence of primer I184A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 160]

This shows the base sequence of primer K186A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 161]

This shows the base sequence of primer K186A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 162]

This shows the base sequence of primer L197A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 163]

This shows the base sequence of primer L197A R used in REFERENCE

90

EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 164]

This shows the base sequence of primer W202A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 165]

This shows the base sequence of primer W202A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 166]

This shows the base sequence of primer E206A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 167]

This shows the base sequence of primer E206A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 168]

This shows the base sequence of primer T212A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 169]

This shows the base sequence of primer T212A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 170]

This shows the base sequence of primer T235A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 171]

This shows the base sequence of primer T235A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 172]

This shows the base sequence of primer K239A used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 173]

This shows the base sequence of primer K239A R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 174]

This shows the base sequence of primer A249G used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 175]

This shows the base sequence of primer A249G R used in REFERENCE EXAMPLE 35.

[SEQ ID NO: 176]

This shows the base sequence of primer 176 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 177]

This shows the base sequence of primer 177 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 178]

This shows the base sequence of primer 178 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 179]

This shows the base sequence of primer 179 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 180]

This shows the base sequence of primer 180 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 181]

This shows the base sequence of primer 181 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 182]

This shows the base sequence of primer 182 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 183]

This shows the base sequence of primer 183 used in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO: 184]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-244-3 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 185]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-244-3 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 186]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-244-3 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 187]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-244-3.

[SEQ ID NO: 188]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-244-3 (base sequence).

[SEQ ID NO: 189]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-244-3 (base sequence).

[SEQ ID NO: 190]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-244-3 (base sequence).

[SEQ ID NO: 191]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

Nec1-244-3.

[SEQ ID NO: 192]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-244-3 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 193]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-244-3 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 194]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-244-3 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 195]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-244-3.

[SEQ ID NO: 196]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-244-3 (base sequence).

[SEQ ID NO: 197]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-244-3 (base sequence).

[SEQ ID NO: 198]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-244-3 (base sequence).

[SEQ ID NO: 199]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-244-3.

[SEQ ID NO: 200]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-530-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 201]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-530-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 202]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-530-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 203]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-530-1.

[SEQ ID NO: 204]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-530-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 205]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-530-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 206]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-530-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 207]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

Nec1-530-1.

[SEQ ID NO: 208]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-530-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 209]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-530-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 210]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-530-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 211]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-530-1.

[SEQ ID NO: 212]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-530-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 213]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-530-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 214]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-530-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 215]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-530-1.

[SEQ ID NO: 216]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-554-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 217]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-554-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 218]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-554-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 219]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-554-1.

[SEQ ID NO: 220]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-554-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 221]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-554-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 222]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-554-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 223]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

Nec1-554-1.

[SEQ ID NO: 224]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-554-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 225]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-554-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 226]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-554-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 227]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-554-1.

[SEQ ID NO: 228]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-554-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 229]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-554-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 230]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-554-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 231]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-554-1.

[SEQ ID NO: 232]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-803-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 233]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-803-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 234]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-803-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 235]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-803-2.

[SEQ ID NO: 236]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-803-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 237]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-803-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 238]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-803-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 239]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

Nec1-803-2.

[SEQ ID NO: 240]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-803-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 241]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-803-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 242]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-803-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 243]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-803-2.

[SEQ ID NO: 244]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-803-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 245]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-803-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 246]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-803-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 247]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-803-2.

[SEQ ID NO: 248]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-834-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 249]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-834-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 250]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-834-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 251]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-834-1.

[SEQ ID NO: 252]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-834-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 253]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-834-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 254]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-834-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 255]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

96

Nec1-834-1.

[SEQ ID NO: 256]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-834-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 257]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-834-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 258]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-834-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 259]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-834-1.

[SEQ ID NO: 260]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-834-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 261]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-834-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 262]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-834-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 263]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-834-1.

[SEQ ID NO: 264]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-845-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 265]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-845-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 266]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-845-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 267]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-845-2.

[SEQ ID NO: 268]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-845-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 269]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-845-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 270]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-845-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 271]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

Nec1-845-2.

[SEQ ID NO: 272]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-845-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 273]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-845-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 274]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-845-2 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 275]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-845-2.

[SEQ ID NO: 276]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-845-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 277]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-845-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 278]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-845-2 (base sequence).

[SEQ ID NO: 279]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-845-2.

[SEQ ID NO: 280]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-903-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 281]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-903-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 282]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-903-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 283]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec1-903-1.

[SEQ ID NO: 284]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec1-903-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 285]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec1-903-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 286]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec1-903-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 287]

This shows the base sequence in the heavy chain variable region of

Nec1-903-1.

[SEQ ID NO: 288]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-903-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 289]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-903-1 (amino acid sequence.

[SEQ ID NO: 290]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-903-1 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 291]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec1-903-1.

[SEQ ID NO: 292]

This shows CDR1 in the light chain of Nec1-903-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 293]

This shows CDR2 in the light chain of Nec1-903-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 294]

This shows CDR3 in the light chain of Nec1-903-1 (base sequence).

[SEQ ID NO: 295]

This shows the base sequence in the light variable region of Nec1-903-1.

[SEQ ID NO: 296]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec8-4116-8 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 297]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec8-4116-8 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 298]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec8-4116-8 (amino acid sequence).

[SEQ ID NO: 299]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec8-4116-8.

[SEQ ID NO: 300]

This shows CDR1 in the heavy chain of Nec8-4116-8 (base sequence).

[SEQ ID NO: 301]

This shows CDR2 in the heavy chain of Nec8-4116-8 (base sequence).

[SEQ ID NO: 302]

This shows CDR3 in the heavy chain of Nec8-4116-8 (base sequence).
[SEQ ID NO: 303]

This shows the amino acid sequence in the heavy chain variable region of Nec8-4116-8.
[SEQ ID NO: 304]

This shows CDR1 in the light chain of Nec8-4116-8 (amino acid sequence).
[SEQ ID NO: 305]

This shows CDR2 in the light chain of Nec8-4116-8 (amino acid sequence).
[SEQ ID NO: 306]

This shows CDR3 in the light chain of Nec8-4116-8 (amino acid sequence).
[SEQ ID NO: 307]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec8-4116-8.
[SEQ ID NO: 308]

This shows CDR1 in the light chain of Nec8-4116-8 (base sequence).
[SEQ ID NO: 309]

This shows CDR2 in the light chain of Nec8-4116-8 (base sequence).
[SEQ ID NO: 310]

This shows CDR3 in the light chain of Nec8-4116-8 (base sequence).
[SEQ ID NO: 311]

This shows the amino acid sequence in the light variable region of Nec8-4116-8.
[SEQ ID NO: 312]

This shows the N-terminal amino acid sequence of H chain in the antibody preparation obtained in REFERENCE EXAMPLE 38.
[SEQ ID NO: 313]

This shows the N-terminal amino acid sequence of L chain in the antibody preparation obtained in REFERENCE EXAMPLE 38.
[SEQ ID NO: 314]

This shows the base sequence encoding the N terminus of putative signal sequence from the germline coincident with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 312.
[SEQ ID NO: 315]

This shows the base sequence encoding the N terminus of putative signal sequence from the germline coincident with the amino acid sequence of SEQ ID NO:

100

313.

[SEQ ID NO: 316]

This shows the base sequence of the primer used in REFERENCE EXAMPLE 38.

[SEQ ID NO: 317]

This shows the base sequence of the primer used in REFERENCE EXAMPLE 38.

Hybridoma Nec1-803-2 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10417 since September 16, 2005.

Hybridoma Nec1-244-3 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10423 since October 4, 2005.

Hybridoma Nec1-530-1 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10424 since October 4, 2005.

Hybridoma Nec1-903-1 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10425 since October 4, 2005.

Hybridoma Nec1-520-1 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10426 since October 4, 2005.

Hybridoma Nec1-845-2 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of

Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10427 since October 4, 2005.

Hybridoma Nec1-834-1 obtained in EXAMPLE 1 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10428 since October 4, 2005.

Hybridoma Nec1-554-1 obtained in EXAMPLE 8 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10681 since September 20, 2006.

Hybridoma Nec1-769-2 obtained in EXAMPLE 8 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10682 since September 20, 2006.

Hybridoma Nec1-964-1 obtained in EXAMPLE 8 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10683 since September 20, 2006.

Hybridoma Nec1-1302-2 obtained in EXAMPLE 8 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10684 since September 20, 2006.

Hybridoma Nec8-4116-8 obtained in EXAMPLE 8 later described has been deposited on International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code: 305-8566) under Accession Number FERM BP-10685 since September 20, 2006.

EXAMPLES

Hereinafter the present invention will be described specifically by referring to REFERENCE EXAMPLES and EXAMPLES but is not deemed to be limited thereto.

REFERENCE EXAMPLE 1

Apoptosis induction in human colon cancer cell line HT-29 by the antisense oligonucleotide of the nectin-2α gene and nectin-2δ gene

After the antisense oligonucleotide sequence (SEQ ID NO: 7) hybridizable to the coding region of nectin-2α gene or to the intron region of nectin-2δ gene was designed, the phosphorothioated oligonucleotide was synthesized to obtain the HPLC-purified product (hereinafter merely referred to as antisense oligonucleotide 1). As a control, the oligonucleotide (SEQ ID NO: 8) having a reverse sequence of the base sequence represented by SEQ ID NO: 7 was likewise phosphorothioated to obtain the HPLC-purified authentic product (hereinafter merely referred to as control oligonucleotide 1).

Human colon cancer cell line HT-29 purchased from American Type Culture Collection (ATCC) was suspended in McCoy's 5A medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (JRH) [hereinafter sometimes abbreviated as M5 medium], and plated on a 96-well flat bottom tissue culture plate (Becton Dickinson) at a cell density of 1×10^4 cells/well, followed by incubation at 37°C overnight in a 5% carbon dioxide gas flow. The antisense oligonucleotide 1, 200 ng, or 200 ng of the control oligonucleotide 1 was mixed with 50 μL of Opti-MEM I (Invitrogen) together with 0.5 μL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and the mixture was allowed to stand at room temperature for 20 minutes. The whole volume of the solution mixture above was added to the HT-29 cell culture, which medium had previously been exchanged with 50 μL of Opti-MEM I, the incubation was continued for further 3 hours at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. Thereafter, the medium was again exchanged with M5 medium. After the incubation was continued for further 2 days, the apoptosis induction activity of the oligonucleotide above was measured using Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) in accordance with the protocol attached. As a result, the antisense oligonucleotide 1 (SEQ ID NO: 7) of the nectin-2α gene and nectin-2δ gene showed the apoptosis induction activity of approximately 1.9 times higher than the control oligonucleotide 1 (SEQ ID NO: 8), indicating that there was a statistically significant difference ($P<0.05$).

REFERENCE EXAMPLE 2

Reduction in mRNA expression levels of nectin-2α gene and nectin-2δ gene in human colon cancer cell line HT-29 by antisense oligonucleotide of nectin-2α gene and nectin-2δ gene

Human colon cancer cell line HT-29 used in REFERENCE EXAMPLE 1 was suspended in M5 medium and plated on a 24-well flat bottom tissue culture plate (Becton Dickinson) at a cell density of 6×10^4 cells/well. After the cells were incubated overnight at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow, the antisense oligonucleotide 1 or the control oligonucleotide 1 was transfected by the procedure of REFERENCE EXAMPLE 1, except that the weight or volume of all additives was scaled up to 6 times in proportion to the count of cells plated. After these cells were incubated at 37°C for 24 hours in a 5% carbon dioxide gas flow, the total RNA was extracted by RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN). Using about 400 ng of the total RNA as a template, reverse transcription was carried out to prepare cDNA using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) in accordance with the protocol attached. Expression level of the nectin-2α gene was measured by quantitative PCR using the cDNA as a template in an amount corresponding to 5 ng when calculated as the total RNA; the reaction solution was made up to 15 μL by adding 7.5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500 nM each of primer 1 (SEQ ID NO: 9) and primer 2 (SEQ ID NO: 10) and 100 nM of FAM-labeled TaqMan probe 1 (SEQ ID NO: 11). PCR was carried out by reacting at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The expression level of nectin-2δ was measured as in the nectin-2α gene by quantitative PCR, in which the cDNA as a template was used in an amount corresponding to 5 ng when calculated as the total RNA and the reaction solution was made up to 15 μL by adding 7.5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix, 500 nM each of primer 3 (SEQ ID NO: 12) and primer 4 (SEQ ID NO: 13) and 100 nM of FAM-labeled TaqMan probe 2 (SEQ ID NO: 14). PCR was carried out by reacting at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The expression level of mRNA for the β-actin gene contained in the same amount of template cDNA was assayed using TaqMan β-actin Control Reagents (Applied Biosystems), which was used as the internal standard.

Where no oligonucleotide was transfected, the expression levels of the nectin-2α and nectin-2δ genes were 0.15% and 0.76% of the β-actin gene expression

levels, respectively. In the groups given with the antisense oligonucleotide 1 (SEQ ID NO: 7), expression levels of the nectin-2α and nectin-2δ genes were 0.095% and 0.45%, respectively, indicating that a statistically significant ($P<0.01$) reduction in the expression level was observed when compared to the case where no oligonucleotide was transfected. On the other hand, in the group given with the control oligonucleotide 1 (SEQ ID NO: 8) used as negative control, expression levels of the nectin-2α and nectin-2δ genes were 0.18% and 0.76%, respectively, indicating that it was the same as in the case where no oligonucleotide was transfected.

These results and the results of REFERENCE EXAMPLE 1 suggest that reduction in expression levels of the nectin-2α and nectin-2δ genes induced the apoptosis of human colon cancer cell line HT-29.

REFERENCE EXAMPLE 3

Cloning and base sequencing of cDNA encoding nectin-2α

Using human lung cancer cell line A549-derived Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences) as a template, PCR was carried out by using primer 5 (SEQ ID NO: 15) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 6 (SEQ ID NO: 16) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRV. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the cDNA described above, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 1 μM each of primer 5 (SEQ ID NO: 15) and primer 6 (SEQ ID NO: 16), 200 μM dNTPs and 10 μL of 2 x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 94°C for 1 minute and then repeating 5 times the cycle set to include 94°C for 5 seconds and 72°C for 4 minutes, 5 times the cycle set to include 94°C for 5 seconds and 70°C for 4 minutes and 35 times the cycle set to include 94°C for 5 seconds and 68°C for 4 minutes. Next, the PCR product was purified using PCR Purification Kit (QIAGEN). The purified product was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was also treated with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. These products were purified usign PCR Purification Kit. The respective DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio) and then transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1 (+)-Nectin-2α bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 2) encoding the nectin-2α

protein (SEQ ID NO: 1) was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 4

Cloning and base sequencing of cDNA encoding nectin-2δ

Using human lung cancer cell line A549-derived Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences) as a template, PCR was carried out by using primer 5 (SEQ ID NO: 15) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 7 (SEQ ID NO: 17) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRV. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the above cDNA used as a template, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 1 μM each of primer 5 (SEQ ID NO: 15) and primer 7 (SEQ ID NO: 17), 200 μM dNTPs and 10 μL of 2 x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 94°C for 1 minute, then repeating 5 times the cycle set to include 94°C for 5 seconds and 72°C for 4 minutes, 5 times the cycle set to include 94°C for 5 seconds and 70°C for 4 minutes and 35 times the cycle set to include 94°C for 5 seconds and 68°C for 4 minutes. The purified product was then eluted with 50 μL of water using PCR Purification Kit (QIAGEN), and using the same as a template, PCR was carried out. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the above PCR product used as a template, 1 U of Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 5 (SEQ ID NO: 15) and primer 8 (SEQ ID NO: 18) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRV, 200 μM dNTPs and 10 μL of 2 x GC Buffer I to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 94°C for 1 minute, then repeating 25 times the cycle set to include 94°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minutes. Next, the PCR product was purified using PCR Purification Kit. The purified product was then digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. Similarly, pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. After these products were purified using PCR Purification Kit, the two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio) and then transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 4) encoding the nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 5

Cell growth inhibition of human colon cancer cell line HT-29 by nectin-2 siRNA

Mixtures were prepared by mixing five siRNAs (siRNA-1, siRNA-2, siRNA-3, siRNA-4 and siRNA-5) specific to mRNA of the nectin-2α gene or nectin-2δ gene (hereinafter they are collectively referred to as the nectin-2 gene) on an equal volume basis (hereinafter the mixtures are referred to as the nectin-2-siRNA). The siRNA-1, siRNA-2, siRNA-3, siRNA-4 and siRNA-5 were prepared by hybridizing two RNA fragments, respectively (siRNA-1 was prepared by hybridizing RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 19 to RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 20, siRNA-2 by hybridizing RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 21 to RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 22, siRNA-3 by hybridizing RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 23 to RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 24, siRNA-4 by hybridizing RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 25 to RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 26, and siRNA-5 by hybridizing RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 27 to RNA having the base sequence represented by SEQ ID NO: 28). Non-specific Control IX (hereinafter referred to as non-silencing dsRNA) purchased from Dharmacon was used as a negative control.

Specifically, human colon cancer cell line HT-29 purchased from American Type Culture Collection (ATCC) was suspended in M5A medium supplemented with 10% FBS (JRH) and plated on a 10-cm tissue culture Petri dish (Becton Dickinson) at a cell density of 5×10^5 cells/dish. After incubation overnight at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow, the cells were detached using a trypsin/EDTA solution and recovered by centrifugal operation. The HT-29 cells, 1×10^6, were suspended in 100 μL of solution V included in Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa), which solution contained 150 pmol of nectin-2-siRNA or 150 pmol of non-silencing dsRNA, and transfected using Nucleofector program T-20, followed by incubation at 37°C for 24 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. These cells were again plated on a 96-well flat bottom tissue culture plate at a cell density of 3,000 cells/well and the incubation was continued for 5 days at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. After the medium was removed from each well, the plate was cooled at -80°C for 5 minutes and allowed to stand at room temperature for 5 minutes to disrupt the cells. Next, 100 μl of an aqueous solution containing 1% PicoGreen (Invitrogen) and 1% IGEPAL-CA630 (ICN) was added to each well, which was allowed to stand at room

temperature for 20 minutes. Then, the fluorescence intensity was measured (excitation wavelength at 485 nm and emission wavelength at 535 nm) using Multilabel Counter (Perkin Elmer) to determine the DNA level in the cells. As a result, the fluorescence intensity decreased by about 38% in the nectin-2-siRNA group, when compared to the non-silencing dsRNA group, indicating that there was a statistically significant difference ($P<0.001$). This reveals that growth of the HT-29 cell line was significantly inhibited by addition of the nectin-2-siRNA.

REFERENCE EXAMPLE 6

Change in cell cycle of human colon cancer cell line HT-29 by nectin-2-siRNA

Human colon cancer cell line HT-29 used in REFERENCE EXAMPLE 1 was suspended in M5A medium and plated on a 10 cm tissue culture Petri dish at a cell density of 5×10^5 cells/dish. After incubation overnight at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow, nectin-2-siRNA or non-silencing dsRNA as a negative control was transfected by a modification of the procedure of REFERENCE EXAMPLE 5. The incubation was continued at 37°C for 24 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. These cells were again plated on a 6-well flat bottom tissue culture plate (Becton Dickinson) at a cell density of 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C for 5 days in a 5% carbon dioxide gas flow. After the culture cells in each well were detached by trypsin-EDTA treatment, cell cycle analysis was performed using FACScan (Becton Dickinson) using CycleTEST Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson). As a result, the ratio of cells in the G0/G1 phase increased by about 13% and the ratio of cells in the S-phase decreased by about 11% in the nectin-2-siRNA group, as compared to the non-silencing dsRNA group used as the negative control. The results suggest that the change in cell cycle of human colon cancer cell line HT-29 was induced by nectin-2-siRNA.

REFERENCE EXAMPLE 7

Reduction in mRNA expression level of nectin-2 in human colon cancer cell line HT-29 by nectin-2-siRNA

Human colon cancer cell line HT-29 used in REFERENCE EXAMPLE 1 was suspended in M5A medium and plated on a 10 cm tissue culture Petri dish at a cell density of 5×10^5 cells/dish. After incubation overnight at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow, nectin-2-siRNA or non-silencing dsRNA as a negative control was transfected by a modification of the procedure of REFERENCE

EXAMPLE 5, followed by incubation at 37°C for 24 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. The total RNA was extracted from these cells using RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN). Using about 100 ng of the total RNA as a template, reverse transcription was performed by using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). The expression level of mRNA of the nectin-2α gene was measured by quantitative PCR, in which the cDNA as a template was used in an amount corresponding to 10 ng when calculated as the total RNA, and the reaction solution was made up to 10 μL by adding 5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500 nM each of primer 1 (SEQ ID NO: 9) and primer 2 (SEQ ID NO: 10) and 100 nM of FAM-labeled TaqMan probe 1 (SEQ ID NO: 11). On the other hand, the expression level of mRNA of the nectin-2δ gene was measured by quantitative PCR, in which the cDNA as a template was used in an amount corresponding to 10 ng when calculated as the total RNA, and the reaction solution was made up to 10 μL by adding 5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix, 500 nM each of primer 3 (SEQ ID NO: 12) and primer 4 (SEQ ID NO: 13) and 100 nM of FAM-labeled TaqMan probe 2 (SEQ ID NO: 14). PCR was carried out by reacting at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The expression level of mRNA for β-actin contained in the same amount of the template cDNA was measured using TaqMan β-actin Control Reagents (Applied Biosystems) and used as the internal standard.

The expression levels of mRNA of nectin-2α and nectin-2δ decreased by 69% and 73%, respectively, in the nectin-2-siRNA group, when compared to the non-silencing dsRNA group used as a negative control, indicating that there was a statistically significant difference ($P<0.001$). These results indicate that the reduction in expression levels of mRNA for the nectin-2α and nectin-2δ genes was induced by nectin-2-siRNA.

REFERENCE EXAMPLE 8

Enhanced expression of nectin-2 mRNA in human cancer tissue

The expression levels of mRNA for the nectin-2 gene between human cancer tissues and human normal tissues were compared and studied by quantitative PCR. As templates for PCR, cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 1 (Cosmo Bio), cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 2 (Cosmo Bio), Human Colon Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences), Human Lung Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences)

and Human Ovary Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) were used. The expression level of mRNA for the nectin-2α gene was measured as follows: 1 μL of cDNA was used as a template and the reaction solution was made up to 15 μL by adding 7.5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500 nM each of primer 1 (SEQ ID NO: 9) and primer 2 (SEQ ID NO: 10) and 100 nM of FAM-labeled TaqMan probe 1 (SEQ ID NO: 11). The expression level of mRNA for the nectin-2δ gene was measured as follows: 1 μL of cDNA was used as a template and the reaction solution was made up to 15 μL by adding 7.5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix, 500 nM each of primer 3 (SEQ ID NO: 12) and primer 4 (SEQ ID NO: 13) and 100 nM of FAM-labeled TaqMan probe 2 (SEQ ID NO: 14), except that the amount of the template was 0.2 μL for cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 1 (Cosmo Bio) and cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 2 (Cosmo Bio). PCR was performed by reacting at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. On the other hand, the expression level of mRNA for β-actin contained in the same amount of the template cDNA was measured and used as the internal standard. As a result, the expression level of mRNA for the nectin-2α gene increased in cancer tissues of 3 donors included in cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 1 (Cosmo Bio) by 1.1 times, 10 times and 4.3 times, respectively, and increased in cancer tissues of 3 donors included in cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 2 (Cosmo Bio) by 12 times, 3.5 times and 21 times, respectively, when compared to the expression level in human normal tissues. Likewise, the expression level of mRNA for the nectin-2α gene increased in cancer tissues of 5 donors included in Human Colon Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) by 4.8 times, 3.2 times, 2.6 times, 1.9 times and 1.8 times, respectively, as compared to normal tissues; in cancer tissues of 5 donors included in Human Lung Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) by 11 times, 3.7 times, 4.1 times, 3.2 times and 1.3 times, respectively, as compared to normal tissues; and, in cancer tissues of 4 out of 5 donors included in Human Ovary Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) by 1.3 times, 1.8 times, 2.6 times and 2.4 times, respectively, as compared to normal tissues. The expression level of mRNA for the nectin-2δ gene in cancer tissues increased in cancer tissues of 2 out of 3 donors included in cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 1 (Cosmo Bio), which was 1.1 times and 5.3 times, respectively, and in cancer tissues of 2 out of 3 donors included in cDNA CeHAT-SD Breast Tumor 2 (Cosmo Bio), which was 2.0 times and 2.5 times, respectively, as compared to the expression level in normal tissues. Likewise,

the expression level of mRNA for the nectin-2δ gene was found in cancer tissues with 3 out of 5 donors included in Human Colon Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) to be 1.3 times, 1.8 times and 1.5 times, respectively, as compared to normal tissues; in cancer tissues of 4 out of 5 donors included in Human Lung Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) to be 4.8 times, 3.7 times, 1.1 times and 1.3 times, respectively, as compared to normal tissues; and in cancer tissues of 4 out of 5 donors included in Human Ovary Matched cDNA Pair Panel (BD Biosciences) to be 4.2 times, 2.1 times, 2.4 times and 4.2 times, respectively. From these results, it was confirmed that mRNA for the nectin-2α gene and nectin-2δ gene was overexpressed in cancer tissues, as compared to normal tissues.

REFERENCE EXAMPLE 9

Comparison in expression level of mRNA of nectin-2 gene in human cancer cell line

Osteosarcoma cell line Saos-2; brain tumor cell lines SK-N-MC, SK-N-AS, SK-N-BE, SK-N-DZ, SK-N-FI, SK-N-SH, D341 Med, Daoy, DBTRG-05MG, U-118 MG, U-87 MG, CCF-STTG1 and SW 1088; breast cancer cell lines HCC1937, ZR-75-1, AU565, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3, BT474, MDA-MB-435s, MDA-MB-436, MDA-MB-468, MDA-MB-175VII and T-47D; colon cancer cell lines Caco-2, COLO 201, COLO 205, COLO 320DM, DLD-1, HCT-15, HCT-8, HT-29, LoVo, LS180, LS123, LS174T, NCI-H548, NCI-SNU-C1, SK-CO-1, SW 403, SW 48, SW 480, SW 620, SW 837, SW 948, HCT 116 and WiDr; non-small cell lung cancer cell lines A549, NCI-H23, NCI-H226, NCI-H358, NCI-H460, NCI-H522, NCI-H661, NCI-H810, NCI-H1155, NCI-H1299, NCI-H1395, NCI-H1435, NCI-H1581, NCI-H1651, NCI-H1703, NCI-H1793, NCI-H2073, NCI-H2085, NCI-H2106, NCI-H2228, NCI-H2342, NCI-H2347, SK-LU-1, NCI-H2122, SK-MES-1 and NCI-H292; small cell lung cancer cell lines NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H889, NCI-H1417, NCI-H1672, NCI-H1836, NCI-H1963, NCI-H2227, NCI-N417 and SHP-77; ovary cancer cell lines ES-2, Caov-3, MDAH2774, NIH:OVCAR3, OV-90, SK-OV-3, TOV-112D and TOV-21G; prostate cancer cell lines DU 145 and LNCaP; human retinoblastoma cell lines WERI-Rb-1 and Y79, testicular cancer cell line Cates-1B (all purchased from ATCC); colon cancer cell line COCM1; non-small cell lung cancer cell line VMRC-LCD and prostate cancer cell line PC3 (all purchased from Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)) were cultured, respectively, in accordance with the culture protocol recommended by ATCC or JCRB. The total

RNA was prepared from the cultured cells using RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN). Using this total RNA as a template, reverse transcription was performed to prepare cDNA. Using this cDNA as a template, quantitative PCR was carried out to measure the expression level of mRNA for the nectin-2 gene.

The expression level of mRNA for the nectin-2 gene was quantified by the procedure described in REFERENCE EXAMPLE 2, using as a template the cDNA obtained from 5 ng of the total RNA described above. On the other hand, the expression level of a gene for β-actin contained in the same amount of the template cDNA was measured and used as the internal standard.

Relative expression levels obtained by standardization of the expression level of mRNA for the nectin-2α gene or the nectin-2δ gene with the expression level of mRNA for the β-actin gene are shown in [TABLE 1]. The results reveal that the expression level of mRNA for the nectin-2α gene was 1% or higher in 2 strains of all the cancer cell lines under investigation and the expression level of mRNA for the nectin-2δ gene was 1% or higher in 12 strains of the cancer cell lines, when compared to the expression level of β-actin mRNA.

TABLE 1

Cell name	Nectin-2 α	Nectin-2 δ	Cell name	Nectin-2 α	Nectin-2 δ	Cell name	Nectin-2 α	Nectin-2 δ
Saos-2	0.04	0.10	HCT-8	0.36	1.44	NCI-H1155	0.06	0.06
CCF-STTG1	0.19	0.39	HT-29	0.35	1.93	NCI-H1299	0.57	0.82
SW 1088	0.17	0.11	LoVo	0.16	0.46	NCI-H1581	0.19	0.61
DBTRG-05MG	0.08	0.18	LS 180	0.17	0.36	NCI-H2106	0.05	0.13
U-118 MG	0.26	0.08	LS123	0.29	0.90	NCI-H187	0.00	0.01
U-87 MG	0.13	0.11	LS174T	0.08	0.44	NCI-H378	0.06	0.11
D341 Med	0.11	0.09	NCI-H548	1.11	2.07	NCI-H526	0.26	0.41
Daoy	0.13	0.11	NCI-SNU-C1	0.19	0.30	NCI-H889	0.07	0.19
SK-N-AS	0.06	0.04	SK-CO-1	0.57	1.35	NCI-H1417	0.08	0.20
SK-N-BE	0.03	0.04	SW 403	0.12	0.49	NCI-H1672	0.07	0.51
SK-N-DZ	0.03	0.03	SW 48	0.21	0.22	NCI-H1836	0.12	0.27
SK-N-FI	0.12	0.17	SW 480	0.14	0.26	NCI-H1963	0.04	0.05
SK-N-SH	0.09	0.19	SW 620	0.10	0.38	NCI-H2227	0.12	0.36
SK-N-MC	0.10	0.09	SW 837	0.36	1.27	NCI-N417	0.00	0.00
AU565	0.05	0.13	SW 948	0.56	1.19	SHP-77	0.10	0.33
MCF-7	0.08	0.68	WiDr	0.21	1.92	NCI-H226	0.04	0.26
MDA-MB-231	0.08	0.11	A549	0.24	0.25	NCI-H1703	0.30	0.48
SK-BR-3	0.31	0.65	NCI-H23	0.15	0.24	NCI-H2122	0.02	0.17
BT474	0.19	0.58	NCI-H358	0.12	0.46	SK-MES-1	0.04	0.12
HCC1937	0.15	0.29	NCI-H522	0.20	0.18	NCI-H292	0.00	1.03
MDA-MB-435s	0.08	0.12	NCI-H1395	0.16	0.39	Caov-3	0.08	0.30
ZR-75-1	0.63	1.57	NCI-H1435	0.40	0.46	MDAH2774	0.12	0.17
MDA-MB-436	0.08	0.15	NCI-H1651	0.07	0.21	NIH:OVCAR3	0.17	0.43
MDA-MB-468	0.04	0.26	NCI-H1793	0.13	0.25	OV-90	1.09	5.06
MDA-MB-175VII	0.03	0.12	NCI-H2073	0.15	0.34	SK-OV-3	0.32	0.72
T-47D	0.08	0.40	NCI-H2085	0.20	0.34	TOV-112D	0.46	0.45
COCM1	0.22	0.77	NCI-H2228	0.34	0.44	TOV-21G	0.24	0.25
Caco-2	0.37	0.99	NCI-H2342	0.64	2.45	ES-2	0.20	0.28
COLO 201	0.16	0.40	NCI-H2347	0.05	0.12	DU 145	0.14	0.60
COLO 205	0.23	0.63	SK-LU-1	0.04	0.10	LNCaP	0.29	0.60
COLO 320DM	0.15	0.24	VMRC-LCD	0.12	0.10	PC3	0.14	0.24
DLD-1	0.35	1.26	NCI-H460	0.12	0.15	Y79	0.11	0.19
HCT 116	0.40	0.71	NCI-H661	0.13	0.44	WERI-Rb-1	0.25	0.54
HCT-15	0.43	0.76	NCI-H810	0.09	0.20	Cates-1B	0.16	0.18

REFERENCE EXAMPLE 10

Preparation of anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody by immunization with nectin-2δ cDNA

Preparation of anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody by DNA immunization using gene gun was entrusted to Genovac (Nosan Corporation). A

vector for animal cell expression wherein cDNA encoding the amino acid sequence of nectin-2δ (SEQ ID NO: 3) was incorporated was coated onto microparticles by the method described in patent literature (WO 00/29442) filed by Genovac, with which two rabbits were immunized using a gene gun. Blood for testing was collected from the ear vein. After increased antibody titer was confirmed in the serum, blood was collected via the carotid artery under anesthesia to obtain 127 mL and 115 mL, respectively.

These anti-sera were diluted in PBS to 2-fold and centrifuged. The supernatant was applied on an antigen column prepared by immobilizing the nectin-2ED-FLAG protein to HiTrap NHS-Activated HP (Amersham Biosciences). After washing with PBS, the column was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 3) containing 0.15 M NaCl. The eluate was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8) and then dialyzed against PBS at 4°C overnight to purify and obtain anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibodies. The anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibodies obtained herein were named N2-R1 and N2-R2, respectively.

REFERENCE EXAMPLE 11

Expression level of nectin-2 protein in human cancer cell lines

The expression level of nectin-2 protein in human cancer cell lines was analyzed by flow cytometry. Human cancer cell lines NCI-H1703, HT-29, OV-90, SKBR-3, SK-OV-3, NCI-H2342, TOV-112D, NCI-H2122, NCI-H292, Capan-2, MDA-MB-231, BxPC-3, HCT-8, SK-N-DZ, Caov-3, DU 145, A549, Caco-2, WiDr, ZR-75-1, HCT-15, NCI-H1299, NCI-H2228 and BT474 (all purchased from ATCC) were cultured, respectively, according to the procedure recommended by ATCC. The cell suspension was prepared at 1 x 10^6/mL using Stain buffer (BD Biosciences), respectively. The anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody (N2-R2) prepared in REFERENCE EXAMPLE 10 was added to the cell suspension at a final concentration of 3 μg/mL, which was reacted at 4°C for an hour. In a similar manner, non-immune rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) was added in a final concentration of 3 μg/mL, which was used as a negative control. After this cell suspension was centrifuged, the cells were washed with Stain buffer and Alexa488-labeled anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) was added thereto at a final concentration of 10 μg/mL, which was reacted at 4°C for an hour. Again, the cells were washed with Stain buffer and provided for FACScan (Becton Dickinson) to measure the expression level of nectin-2 protein in the respective cells. A ratio of

the median value of fluorescence intensities for the N2-R2-stained cells to the median value of fluorescence intensities of the negative control for each cell line is shown in [TABLE 2]. The results reveal that the nectin-2 protein was highly expressed in human cancer cell lines from plural kinds of cancer such as lung cancer, breast cancer, ovarian cancer, etc.

TABLE 2

Cell name	Ratio	Cell name	Ratio
NCI-H1703	72.5	HCT-8	48.8
HT-29	65.5	SK-N-DZ	6.0
OV-90	133.4	Caov-3	28.4
SKBR-3	61.6	DU 145	17.9
SK-OV-3	65.0	A549	16.9
NCI-H2342	62.1	Caco-2	50.5
TOV-112D	44.1	WDr	50.0
NCI-H2122	28.1	ZR-75-1	25.5
NCI-H292	10.6	HCT-15	25.9
Capan-2	83.6	NCI-H1299	36.9
MDA-MB-231	17.0	NCI-H2228	20.9
BxPC-3	46.6	BT474	42.0

REFERENCE EXAMPLE 12

Construction of animal cell expression vector for recombinant nectin-2 extracellular domain-FLAG protein

Using as a template the animal cell expression vector (pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ) prepared in REFERENCE EXAMPLE 4, PCR was carried out by using primer 33 (SEQ ID NO: 29) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 34 (SEQ ID NO: 30) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ, 2.5 U of PfuUltra Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 0.2 μM each of primer 33 (SEQ ID NO: 29) and primer 34 (SEQ ID NO: 30), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10 x Pfu Ultra Buffer (STRATAGENE), which was made the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 2 minutes and then repeating 30 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute and 15 seconds,

followed by reacting at 72°C for 10 minutes. Next, the PCR product was purified using PCR Purification Kit (QIAGEN). The purified product was then digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. Similarly, pCMV-Tag4 (STRATAGENE) was also digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. Each DNA fragment was purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). The two fragments were ligated using Ligation High (TOYOBO). The plasmid obtained was transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) and incubated for selection in kanamycin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pCMV-Tag4-Nectin-2ED-FLAG having the cDNA sequence (SEQ ID NO: 32) encoding the nectin-2ED-FLAG protein (SEQ ID NO: 31) with a FLAG tag at the C terminus of the extracellular domain (1st-361st amino acid sequence of nectin-2δ represented by SEQ ID NO: 3) of the nectin-2δ protein was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 13

Preparation of recombinant nectin-2ED-FLAG protein

The nectin-2ED-FLAG protein encoded by the animal cell expression vector (pCMV-Tag4-Nectin-2ED-FLAG) prepared in REFERENCE EXAMPLE 12 was prepared using FreeStyle293 Expression System (Invitrogen). Specifically, the animal cell expression vector pCMV-Tag4-Nectin-2ED-FLAG was transfected to the 293F cell line using 293 Fectin (Invitrogen), followed by spinner culture at 37°C for 3 days in an 8% carbon dioxide gas flow. The cell suspension was centrifuged and the resulting culture supernatant was filtrated through a 0.45 μm filter. The filtrate was applied on an anti-FLAG antibody column (Sigma), which had been equilibrated with phosphate buffered saline (PBS). After washing the column with PBS, the nectin-2ED-FLAG protein was eluted with PBS containing 0.1 mg/mL of the FLAG peptide. After this eluted fraction was concentrated by ultrafiltration using Vivaspin (VIVA SCIENCE), the contaminated FLAG peptide was removed by using a gel filtration column PD-10 (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS and concentrated again to obtain the recombinant nectin-2ED-FLAG protein with high purity.

REFERENCE EXAMPLE 14

Preparation of anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody

Anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody was prepared using the recombinant nectin-2ED-FLAG protein prepared in REFERENCE EXAMPLE 13 as an immunogen. A PBS solution of the nectin-2ED-FLAG protein and Freund's complete adjuvant were mixed in equal volumes. Using the emulsion thus prepared, three domestic rabbits (Japanese white rabbit, female, 3 kg) were immunized with 0.1 mg/animal of the nectin-2ED-FLAG protein subcutaneously and intracutaneously at the back of the animal. For the second and subsequent immunization, the protein emulsion was likewise prepared using Freund's incomplete adjuvant and booster was repeated 7 times every 2 weeks.

Prior to the immunization and a week after the fourth and sixth booster, blood was collected for testing through the ear vein. An increase in the antibody titer in sera was confirmed by ELISA using an immunoplate coated with the nectin-2ED-FLAG protein. A week after the last booster, blood was collected from the three rabbits through the carotid artery under anesthesia to obtain the anti-sera of 78.9 ml, 78.2 ml and 78.8 ml, respectively.

These anti-sera were diluted in PBS to 2-fold and centrifuged. The supernatant was applied onto an antigen column prepared by immobilizing the nectin-2ED-FLAG protein to HiTrap NHS-Activated HP (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Bio-sciences). After washing with PBS, the column was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 3) containing 0.15 M NaCl. The eluate was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8) and then dialyzed against PBS at 4°C overnight to obtain anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibodies (N2-No. 1, N2-No. 2 and N2-No. 3).

REFERENCE EXAMPLE 15

Construction of animal cell expression vector for recombinant nectin-2 extracellular domain-Fc protein

(1) Cloning of human IgG1-Fc fragment gene

Using human spleen-derived Marathon-Ready cDNA (BD BIOSCIENCES) as a template, PCR was carried out using primer 33 (SEQ ID NO: 33) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 34 (SEQ ID NO: 34) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the cDNA described above, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 1 μM each of primer 33 (SEQ ID NO: 33) and primer 34 (SEQ ID NO: 34), 200 μM dNTPs and 10 μL of 2 x

GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minutes and then repeating 30 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minute. Next, the PCR product was purified with PCR Purification Kit (QIAGEN). The purified product was then digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. The pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was also digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. These products were purified using PCR Purification Kit. The two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio) and then transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-hFc bearing a cDNA sequence encoding the Fc region of human IgG1 was obtained.

(2) Construction of nectin-2 extracellular domain-human Fc chimeric protein expression vector

Using the pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 4 as a template, PCR was carried out by using primer 35 (SEQ ID NO: 35) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII and primer 36 (SEQ ID NO: 36) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI. In this reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pcDNA3.1 (+)-Nectin-2δ, 2.5 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 0.2 μM each of primer 35 (SEQ ID NO: 35) and primer 36 (SEQ ID NO: 36), 200 μM dNTPs and 10 μL of 2 x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 20 μL. PCR was performed by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 35 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minutes and 30 seconds. The PCR product was separated by agarose gel electrophoresis, purified using Gel Extraction Kit (QIAGEN) and digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI. Similarly, pcDNA3.1 (+)-hFc was also digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI. The two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 and then transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector (pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc) bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 38) encoding the fused protein (SEQ ID NO: 37) of the extracellular domain of nectin-2δ protein (1st-350th in the amino acid sequence of

nectin-2δ represented by SEQ ID NO: 3) to the Fc region of human IgG1 was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 16

Preparation of recombinant nectin-2ED-Fc protein

The nectin-2ED-hFc protein encoded by the animal cell expression vector (pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc) prepared in REFERENCE EXAMPLE 15 was prepared using FreeStyle293 Expression System (Invitrogen). Specifically, pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc was transfected to the 293F cell line using 293 Fectin (Invitrogen), followed by spinner culture at 37°C for 3 days in an 8% carbon dioxide gas flow. The cell suspension was centrifuged and the resulting culture supernatant was filtrated through a 0.22 μm filter and the filtrate was applied onto a rProteinA Sepharose FF column (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Bio-sciences) equilibrated with PBS. After washing the column with PBS, elution was performed with 0.1 M glycine-HCl (pH 3.5) containing 0.15 M NaCl and the eluate was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8). After the eluted nectin-2ED-hFc fraction was dialyzed against PBS at 4°C overnight, the fraction was concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra15 30MWCO (MILLIPORE) to obtain the recombinant nectin-2ED-Fc protein.

REFERENCE EXAMPLE 17

Preparation of anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody using peptide antigen

Based on the amino acid sequences of nectin-2α protein (SEQ ID NO: 1) and nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3), the following 3 peptides (peptides 1 - 3) consisting of 15 amino acids were synthesized.

Amino acid sequence of peptide 1

[Cys-Lys-Met-Gly-Pro-Ser-Phe-Pro-Ser-Pro-Lys-Pro-Gly-Ser-Glu (SEQ ID NO: 39)] is a sequence wherein Cys residue is added to the 88th-101st amino acid sequence of nectin-2α protein (SEQ ID NO: 1) and nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) at its N terminus.

Amino acid sequence of peptide 2

[Arg-Glu-Thr-Pro-Arg-Ala-Ser-Pro-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Leu-Cys (SEQ ID NO: 40)] is a sequence wherein Cys residue is added to the 347th-360th amino acid sequence of nectin-2α protein (SEQ ID NO: 1) at its C terminus.

Amino acid sequence of peptide 3

[Cys-Thr-Leu-Gly-Ala-Ser-Glu-His-Ser-Pro-Leu-Lys-Thr-Pro-Tyr (SEQ ID NO: 41)] is a sequence wherein Cys residue is added to the 426th-439th amino acid sequence of nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) at its N terminus.

Each of peptide 1, peptide 2 and peptide 3 described above was chemically bound to maleimide keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Pierce) as a carrier protein, which was used as an immunogen. Male rabbit KBL: JW (11 weeks old, Kitayama Labes) was used as an animal for immunization. An emulsion composed of the immunogen above and Freund's complete adjuvant (Difco) was used for primary immunization and an emulsion composed of the immunogen above and Freund's incomplete adjuvant (Difco) was used for the second and subsequent immunization. These emulsions were injected subcutaneously at the back in 0.5 mg each as the protein 4 times in total every 2 weeks. On day 52 after the primary immunization, blood was collected through the carotid artery under anesthesia and the serum of 70 ml, 66 ml or 72 ml was obtained from the rabbit immunized with peptide 1, peptide 2 or peptide 3, respectively. The immunoglobulin fraction was concentrated from the sera thus obtained by ammonium sulfate salting-out, and purified by a protein A affinity column (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Bio-sciences) to give the IgG antibody fraction. The IgG antibody thus obtained was applied onto the anitigen-immobilized column, in which each peptide was coupled to a Activated Thiol Sepharose 4B column (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare) via the Cys residue. After the column was washed with PBS, the peptide-specific antibody was eluted using 8M urea-containing PBS. The eluates were dialyzed against PBS to remove urea, which was followed by ultraconcentration and sterilization by filtering. Thus, the purified anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibodies (AS-2704, AS-2705 and AS-2706) against peptides 1, 2 and 3 were obtained.

REFERENCE EXAMPLE 18

Establishment of NS0 cell line stably expressing the recombinant full-length nectin-2δ

The NS0 cell line stably expressing the nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was established. To obtain the animal cell expression vector pEE12.4-Nectin-2δ, pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 4 was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. Likewise, the animal cell expression vector pEE12.4 (Lonza Biologics) was digested with restriction enzymes EcoRI and SmaI.

These products were subjected to agarose gel electrophoresis and the desired fragments were excised out to purify using MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN). The two DNA fragments were ligated using Ligation High (TOYOBO), which was then transfected to Competent High DH5α (TOYOBO) and incubated for selection in ampicillin-containing LB agar medium. The grown colony of Escherichia coli was incubated in ampicillin-containing LB medium, and the cells was collected by centrifugation. The plasmid was prepared from the thus recovered cells using QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). After the plasmid was digested with restriction enzyme EcoRI, the insertion of the nectin-2δ gene was confirmed by an agarose gel electrophoresis. Thus, the animal cell expression vector pEE12.4-Nectin-2δ having the cDNA sequence (SEQ ID NO: 4) encoding the nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was obtained. Using Gene Pulser (Bio-Rad), 40 μg of the pEE12.4-Nectin-2δ linearized by restriction enzyme (PvuI) digestion was transfected (250V, 400 μF) to NS0 cells (2×10^7). The cells were resuspended in DMEM medium (JRH) supplemented with 10% dialyzed FBS (Invitrogen) and 2 mM L-glutamine, and plated on 96-well flat bottom tissue culture plates at 8,000 cells/50 μL per well on 16 plates, at 2,000 cells/50 μL per well on 20 plates and at 400 counts/50 μL per well on 40 plates. After incubation at 37°C for 24 hours in an 8% carbon dioxide gas flow, 150 μL each of GS-selection DMEM medium (JRH) supplemented with 10% dialyzed FBS and GS supplement (JRH) was added to each well. The incubation was continued at 37°C for 3 to 4 weeks in an 8% carbon dioxide gas flow. The grown colony in the abovementioned selection medium was again plated on a 24-well flat bottom tissue culture plate. The total RNA was extracted from the grown cells using RNeasy 96 Kit (QIAGEN). Quantitative PCR was then performed using TaqMan One Step PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems) to select the cell line highly expressing nectin-2δ mRNA. The total RNA, 100 ng, was used as a template, and the reaction solution for quantitative PCR was made up to 50 μL by adding 25 μL of 2X Master Mix (Applied Biosystems), 1.25 μL of 40X MultiScribe (Applied Biosystems), 50 nM each of primer 42 (SEQ ID NO: 42) and primer 43 (SEQ ID NO: 43) and 50 nM of FAM-labeled TaqMan probe 3 (SEQ ID NO: 44). PCR was performed by reacting at 48°C for 30 minutes and 95°C for 10 minutes and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. As a result, 12 strains of NS0 cells highly expressiing the nectin-2δ mRNA were selected and obtained.

Expression levels of the nectin-2δ protein in these 12 strains were compared

by flow cytometry using anti-nectin-2 peptide rabbit polyclonal antibody (AS-2704) prepared in REFARENCE EXAMPLE 17 and among them, the NS0 cell line (#2-75) highly expressing the nectin-2δ protein was selected and obtained.

REFERENCE EXAMPLE 19

Establishment of the FM3A cell line stably expressing the recombinant full-length nectin-2δ

The FM3A cell line stably expressing the nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was established. To obtain the animal cell expression vector pEF1-Nectin-2δ, pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 4 was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. Likewise, the animal cell expression vector pEF1/myc-His A (Invitrogen) was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. These products were purified by PCR Purification Kit (QIAGEN) and the two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio), which was then transfected to Competent High JM109 (TOYOBO) and incubated for selection in ampicillin-containing LB agar medium. The grown colony of Escherichia coli was incubated in ampicillin-containing LB medium, and the cells was collected by centrifugation. The plasmid was prepared from the thus recovered cells using QIAprep Turbo Miniprep Kit (QIAGEN). After the plasmid was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV, the insertion of the nectin-2δ gene was confirmed by agarose gel electrophoresis, and the animal cell expression vector pEF1-Nectin-2δ having the cDNA sequence (SEQ ID NO: 4) encoding the nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was obtained.

Using Gene Pulser (Bio-Rad), 40 μg of the pEF1-Nectin-2δ was transfected (350V, 950 μF) to FM3A cells (1 x 10^7). The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Invitrogen), and incubated at 37°C for 18 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. The gene-transfected cells were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 1 mg/mL Geneticine (Invitrogen), and plated on 96-well flat bottom tissue culture plates at 1,000 cells/200 μL/well and 100 cells/200 μL/well on 20 plates each. The culture was continued at 37°C for 1 to 2 weeks in a 5% carbon dioxide gas flow. The grown colony in the abovementioned selection medium was again plated on a 24-well flat bottom tissue culture plate. The total RNA was extracted from the grown cells using RNeasy 96 Kit (QIAGEN). Quantitative PCR was then performed using TaqMan One Step PCR Master Mix Reagents Kit (Applied

Biosystems) to select the cell line highly expressing nectin-2δ mRNA. The total RNA, 100 ng, was used as a template, and the reaction solution for quantitative PCR was made up to 50 μL by adding 25 μL of 2X Master Mix (Applied Biosystems), 1.25 μL of 40X MultiScribe (Applied Biosystems), 50 nM each of primer 1 (SEQ ID NO: 9) and primer 2 (SEQ ID NO: 10) and 50 nM of FAM-labeled TaqMan probe 1 (SEQ ID NO: 11). PCR was performed by reacting at 48°C for 30 minutes and 95°C for 10 minutes and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. As a result, 7 strains of FM3A cells highly expressing the nectin-2δ mRNA were obtained.

Expression levels of the nectin-2δ protein in these 7 strains were compared by flow cytometry using anti-nectin-2 peptide rabbit polyclonal antibody (AS-2704) prepared in REFARENCE EXAMPLE 17 and among them, the FM3A cell lines (#58, #60) that highly expressed the nectin-2δ protein were selected and obtained. Moreover, these cell lines were resuspended in the selection medium described above and plated on a 96-well flat bottom tissue culture plate at 3 counts/200 μL, 1 cell/200 μL/well and 0.3 cell/200 μL/well, respectively. The culture was continued at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. A portion of the cell line grown as a single colony was provided for the flow cytometry described above, and the clone (#60-6) showing a high expression level of the nectin-2δ protein was selected and obtained.

REFERENCE EXAMPLE 20

Establishment of the CHO-K1 cell line stably expressing the recombinant full-length nectin-2δ

The CHO-K1 cell line stably expressing the nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was established. The nectin-2δ animal cell expression vector (pEE12.4-Nectin-2δ) constructed in REFERENCE EXAMPLE 18 was linearized by digestion with restriction enzyme PvuI, and 40 μg of the linearized vector was transfected to CHO-K1 cells (1×10^7) using Gene Pulser. The cells were resuspended in DMEM medium (JRH) supplemented with 10% dialyzed FBS and GS supplement (JRH) and plated on 96-well flat bottom tissue culture plates at 2,500 cells/50 μL/well on 40 plates. After incubation at 37°C for 24 hours in a 5% carbon dioxide gas flow, 150 μL each of the abovementioned medium containing 33.3 μM or 66.6 μM MSX (ICN) was added to 20 plates, respectively. The selection culture was continued at 37°C for 3 to 4 weeks in a 5% carbon dioxide gas flow. The colony grown in the selection medium described above was again plated on a 24-well

flat bottom tissue culture plate. The total RNA was obtained from the cells using RNeasy 96 Kit (QIAGEN), , and reverse transcription was performed using the RNA as a template. A quantitative PCR was further conducted using this reaction product as a template, and the top 60 clones highly expressing nectin-2δ mRNA were selected and obtained.

Expression levels of the nectin-2δ protein of these 60 clones were compared by flow cytometry using anti-nectin-2 peptide rabbit polyclonal antibody (AS-2704) prepared in REFARENCE EXAMPLE 17 to select and obtain the CHO-K1 cell line (43-2) highly expressing the nectin-2δ protein.

REFERENCE EXAMPLE 21

Construction of animal cell expression vector for recombinant nectin-3 extracellular domain-Fc protein

(1) Cloning of mouse IgG2a-Fc fragment

Using mouse spleen-derived Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences) as a template, PCR was carried out by using primer 45 (SEQ ID NO: 45) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 46 (SEQ ID NO: 46) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the above cDNA, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 1 μM each of primer 45 (SEQ ID NO: 45) and primer 46 (SEQ ID NO: 46), 200 μM dNTPs and 10 μL of 2 x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 30 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minutes. Next, the PCR product was purified with PCR Purification Kit (QIAGEN). The product was then digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. Similarly, pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) was also digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. The two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio) and then transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-mFc bearing a cDNA sequence encoding the Fc region of mouse IgG2a was obtained.

(2) Construction of nectin-3 extracellular domain-human Fc chimeric protein expression vector

Using human lung cancer cell line A549-derived Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences) as a template, PCR was carried out by using primer 47 (SEQ ID NO: 47) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII and primer 48 (SEQ ID NO: 48) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the above cDNA, 2.5 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 47 (SEQ ID NO: 47) and primer 48 (SEQ ID NO: 48), 200 μM dNTPs and 25 μL of 2 x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 35 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minutes. Next, the PCR product was purified using PCR Purification Kit. The purified product was then digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI. Similarly, pcDNA3.1(+)-hFc prepared in REFARENCE EXAMPLE 15 was digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI. The reaction product was separated by agarose gel electrophoresis and purified using Gel Extraction Kit (QIAGEN). The two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 and then transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-3ED-hFc bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 50) encoding the fusion protein (SEQ ID NO: 49) of the extracellular domain (1st to 404th in the amino acid sequence of nectin-3 represented by SEQ ID NO: 5) of nectin-3 protein to the Fc region of human IgG1 was obtained.

(3) Construction of nectin-3 extracellular domain-mouse Fc chimeric protein expression vector

The animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-3ED-hFc obtained in (2) was digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI, the products were separated by agarose gel electrophoresis, and the DNA fragment encoding the extracellular domain of the nectin-3 protein was excised out and purified with Gel Extraction Kit. Similarly, pcDNA3.1(+)-mFc obtained in (1) was digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI, the reaction products were separated by agarose gel electrophoresis, and the DNA fragment was excised out and purified with Gel Extraction Kit. The two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2, which was then transfected to Escherichia coli TOP10 and incubated for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing

analysis of individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-3ED-mFc bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 52) encoding the fused protein (SEQ ID NO: 51) of the extracellular domain of nectin-3 protein (1st-404th in the amino acid sequence of nectin-3 represented by SEQ ID NO: 5) to the mouse Fc region was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 22

Preparation of recombinant nectin-3ED-mFc protein

The nectin-3ED-mFc protein encoded by pcDNA3.1(+)-Nectin-3ED-mFc prepared in REFERENCE EXAMPLE 21 was prepared using FreeStyle293 Expression System (Invitrogen). Specifically, pcDNA3.1(+)-Nectin-3ED-mFc was transfected to the 293F cell line using 293 Fectin (Invitrogen), followed by spinner culture at 37°C for 3 days in an 8% carbon dioxide gas flow. The cell suspension was centrifuged and the resulting culture supernatant was filtrated through a 0.22 μm filter and the filtrate was applied onto an rProteinA Sepharose FF column (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS. After washing the column with PBS, elution was performed with 0.1 M glycine-HCl (pH 3.5) containing 0.15 M NaCl. The eluate was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8). After the eluted nectin-3ED-Fc fraction was dialyzed against PBS at 4°C overnight, the fraction was concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra15 30MWCO (MILLIPORE) to obtain the recombinant nectin-3ED-mFc protein.

REFERENCE EXAMPLE 23

Purification of anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody

To reduce non-specific reactions in immunohistochemical staining (IHC), the anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody N2-No. 2 prepared in REFERENCE EXAMPLE 14 was applied onto the nectin-3ED-FLAG column prepared by immobilizing the nectin-3ED-FLAG protein prepared in REFERENCE EXAMPLE 26 onto HiTrap NHS-Activated HP (GE Healthcare) to remove the antibody fraction bound to the FLAG tag. The nectin-2-specific rabbit polyclonal antibody fraction which passed through the column was recovered as N2-No. 2-2, which was used for the IHC test.

REFERENCE EXAMPLE 24

Enhanced expression of nectin-2 protein in human cancer tissues

Expression of the nectin-2 protein in human cancer tissues was examined by IHC. Specifically, human breast cancer tissue array (Cybrdi), human ovarian cancer tissue array (Cybrdi) and human normal tissue array (Biomax) were subjected to a paraffin removal treatment, immersed in an antigen retrieval solution (DAKO) and then treated at 121°C for 15 minutes in an autoclave. Next, these tissue arrays were washed with water, treated with 3% hydrogen peroxide at room temperature for 7.5 minutes and washed with PBS, followed by blocking with goat serum (Vectastain) at room temperature for 20 minutes. After the goat serum was removed, the arrays were reacted with an antibody-dilution buffer (DAKO) containing 1 μg/mL of N2-No. 2-2 purified in REFERENCE EXAMPLE 23 at 4°C overnight. The arrays were washed with PBS and then reacted with ENVISION+ (DAKO) at room temperature for 30 minutes. After washing again with PBS, a DAB substrate (Merck) solution containing 0.01% hydrogen peroxide was added to the tissue arrays and reacted at room temperature for 3 minutes. Thereafter, the arrays were washed with water and immersed in hematoxylin for a minute, followed by dehydration-treatment. Microscopic observation of the tissues spotted on each array revealed that expression of the nectin-2 protein was significantly enhanced in the cancer tissues at the rates shown in TABLES 2A and 2B.

TABLE 2A

Breast tissues

Classification	Positive Rate
Infiltrating ductal carcinoma	89% (16/18)
Ductal carcinoma	100% (7/7)
Infiltrating lobular carcinoma	100% (9/9)
Medullary carcinoma	50% (3/6)
Mucinous adenocarcinoma	71% (5/7)
Paget's disease	100% (7/7)
Normal breast	0% (0/5)

TABLE 2B

Ovarian Tissues

Classification	Positive rate

Epithelial	Serous carcinoma	55%	(22/40)
	Granular carcinoma	100%	(3/3)
	Clear cell carcinoma	50%	(1/2)
	Endometrioid carcinoma	0%	(0/1)
	Mucinous carcinoma	25%	(1/4)
	Brenner tumor	100%	(1/1)
Germinoma		0%	(0/4)
Theca cell carcinoma		100%	(1/1)
Metastatic carcinoma		17%	(1/6)
Normal ovary		0%	(0/3)

REFERENCE EXAMPLE 25

Construction of animal cell expression vector for recombinant nectin-3 extracellular domain-FLAG protein

In preparing the animal cell expression vector of recombinant nectin-3 extracellular domain-FLAG protein, a vector to which the FLAG tag sequence could be added was first constructed. Specifically, two synthetic DNAs, FLAG-FSALNOT (SEQ ID NO: 53) or FLAG-RSALNOT (SEQ ID NO: 54), 5' end of which was phosphorylated was diluted in TE (1 mM EDTA-containing Tris-HCl (pH 8)) to be 50 μM, respectively, mixed in equal volumes, heated at 95°C for 10 minutes and then gradually cooled for annealing. Next, an animal cell expression vector pCI-neo (Promega) was digested with restriction enzymes NheI and NotI, and the reaction products were subjected to agarose gel electrophoresis and the vector fragment was extracted with Gel Extraction Kit (QIAGEN). The annealed synthetic DNA described above was mixed with this restriction enzyme-treated pCI-neo and the mixture was subjected to ligation using Ligation High (TOYOBO) to construct the animal cell expression vector pCI-FLAG which contained FLAG tag sequence.

Next, using the pcDNA3.1(+)-Nectin-3ED-hFc prepared in REFERENCE EXAMPLE 21 as a template, PCR was carried out by using primer 55 (SEQ ID NO: 55) tagged with the recognition site of restriction enzyme SalI and primer 56 (SEQ ID NO: 56) tagged with the recognition site of restriction enzyme NheI. In this reaction, the reaction solution was composed of the pcDNA3.1 (+)-Nectin-3ED-hFc used as a template, 2.5 U of Pyrobest DNA Polymerase (Takara Bio), 0.5 μM each of primer 55 (SEQ ID NO: 55) and primer 56 (SEQ ID NO: 56), 200 μM dNTPs and 5

μL of 10 x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 50 μL. PCR was performed by reacting at 94°C for 2 minutes and then repeating 30 times the cycle set to include 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute and 30 seconds, followed by reacting at 68°C for 2 minutes. Next, the PCR product was purified using Gel Extraction Kit (QIAGEN) and then digested with restriction enzymes SalI and NheI. Similarly, the pCI-FLAG described above was digested with restriction enzymes SalI and NheI. After the two DNA fragments were purified using PCR Purification Kit, the two DNA fragments were ligated using Ligation High (TOYOBO). The product obtained was transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing analysis of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pCI-Nectin-3ED-FLAG bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 58) encoding the nectin-3ED-FLAG protein (SEQ ID NO: 57), which was the N terminal 404 amino acid sequence of the nectin-3 protein (SEQ ID NO: 5) FLAG-tagged at the C terminus was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 26

Preparation of recombinant nectin-3ED-FLAG protein

The nectin-3ED-FLAG protein encoded by the animal cell expression vector (pCI-Nectin-3ED-FLAG) constructed in REFERENCE EXAMPLE 25 was prepared using FreeStyle293 Expression System (Invitrogen). Specifically, the animal cell expression vector pCI-Nectin-3ED-FLAG was transfected to the 293F cell line using 293 Fectin (Invitrogen), followed by spinner culture at 37°C for 3 days in an 8% carbon dioxide gas flow. The cell suspension was centrifuged and the resulting culture supernatant was filtrated through a 0.45 μm filter and the filtrate was applied onto an anti-FLAG antibody column (Sigma) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.3 M NaCl. After washing the column with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.3 M NaCl, the nectin-3ED-FLAG protein was eluted with the same buffer containing 0.1 mg/mL of the FLAG peptide. After the eluted fraction was concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra 15 (30K MWCO) (Millipore), the fraction was applied onto a PD-10 Desalting column (GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS to remove the contaminated FLAG peptide, and concentrated again to obtain the recombinant nectin-3ED-FLAG protein of high purity.

REFERENCE EXAMPLE 27

Preparation of anti-nectin-3 rabbit polyclonal antibody

Anti-nectin-3 rabbit polyclonal antibody was prepared using the recombinant nectin-3ED-FLAG protein prepared in REFERENCE EXAMPLE 26 as an immunogen. A PBS solution of the nectin-3ED-FLAG protein was mixed with Freund's complete adjuvant (Difco) in equal volumes. Using the emulsion thus prepared, two domestic rabbits (Japanese white rabbit, female, 3 kg) were immunized subcutaneously and intracutaneously with the nectin-3ED-FLAG protein at 0.1 mg each/animal at the back of the animal. For the second and subsequent immunization, the protein emulsion was likewise prepared using Freund's incomplete adjuvant (Difco) and booster was repeated 7 times every 2 weeks.

Prior to the immunization and a week after the fourth and sixth booster, blood was collected for testing through the ear vein. An increase in the antibody titer in sera was confirmed by ELISA using an immunoplate coated with the nectin-3ED-FLAG protein. A week after the last booster, blood was collected from the two rabbits through the carotid artery under anesthesia to give the anti-sera of 78.9 ml and 78.8 ml, respectively.

These anti-sera were diluted in PBS to 2-fold and centrifuged. The supernatant was applied onto an antigen column prepared by immobilizing the nectin-3ED-FLAG protein to HiTrap NHS-Activated HP (GE Healthcare Bio-sciences). After washing with PBS, the column was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 3) containing 0.15 M NaCl. The eluate was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8) and then dialyzed against PBS at 4°C overnight to obtain anti-nectin-3 rabbit polyclonal antibodies (N3-No. 1 and N3-No. 3).

REFERENCE EXAMPLE 28

Large scale production of anti-nectin-2 human monoclonal antibody

Eleven anti-nectin-2 human monoclonal antibodies used for the *in vivo* assay of anti-tumor activity were prepared from the antibody-producing hybridomas (Nec1-803-2, Nec1-964-1, Nec1-303-2, Nec1-554-1, Nec1-1302-2, Nec1-769-2, Nec1-1305-1, Nec1-141-3, Nec1-209-2, Nec1-909-1 and Nec1-847-2). A typical example of the method for production is described below. After expanding the culture of the hybridoma cell line described above at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow in IH medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium : Ham's F-12 = 1:1,

0.1 mM MEM non-essential amino acid solution, 1 mM sodium pyruvate solution, 2 mM L-glutamine solution; Invitrogen) containing 10% FBS, Ultra-Low IgG (Invitrogen), the cells were further expanded with a primary adaption medium (IH medium: CD Hybridoma Medium, 8 mM L-glutamine solution = 1:1, Invitrogen), followed by incubation for one day. These were further expanded with the medium for main culture (IH medium: CD Hybridoma Medium, 8 mM L-glutamine solution = 1:3, Invitrogen), followed by the incubation for 5 to 7 days in a spinner flask at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow, or in an agitation culture tank of 50 L volume, under the conditions of 2 ppm dissolved oxygen concentration, pH 7.0 and 40 rpm rotation number of the agitation. In the latter case, a glucose solution and an L-glutamine solution was added during the incubation based on analysis of the medium components. The main culture was terminated at a cell viability of about 50%.. After termination of the culture, the culture supernatant was harvested by centrifugation (7,460 x g, 20 minutes)..

Each hybridoma supernatant thus obtained was concentrated and applied onto an ultrafiltration membrane (Hydrosart membrane, molecular weight cut-off, 10,000; Sartorius AG) for buffer exchange to 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl , followed by a centrifugation (14,300 x g, 20 minutes) to obtain the supernatant. The supernatant was further microfiltrated (Stericup HV, 0.45 μm; Millipore) to obtain the concentrate, and it was adsorbed to a Protein A Sepharose column (22 mm ID x 79 mm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl. After washing the column with 20 column volume of the same buffer, the antibody fraction adsorbed to the column was eluted out with 20 column volume of 0.1 M sodium citrate buffer (pH 3.0). Immediately thereafter, the fraction was neutralized by adding 1/10 volume of 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0). After concentrating the antibody solution using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 30,000; Millipore), the concentrate was applied onto the Superdex 200 column (26 mmID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS and eluted with the same buffer to give the antibody monomer fraction. It was passed through an ActiClean ETox column (25 mmID x 59 mm, Sterogene Bioseparations) to remove endotoxin, followed by a concentration using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 10,000; Millipore). The concentrate was further filtrated aseptically (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) to give the purified antibody preparation.

Since the antibody fraction purified from the culture supernatant of

hybridoma Nec1-554-1 with Protein A column was found to be exceptionally a mixture of the active and inactive antibodies, the antibody fraction was further separated on a cation exchange column to collect the active fraction. Specifically, the Protein A-purified antibody fraction described above was diluted 3-time with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and adsorbed to an SP-5PW column (21.5 mmID x 150 mm, Toso) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 100 mM NaCl. After washing the column with about 2 column volume of 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 100 mM NaCl, the active antibody fraction and the inactive antibody fraction was separately eluted with a linear gradient of the NaCl concentration from 100 mM to 300 mM over 70 minutes, and the active antibody fraction (SP3) was collected.. Thus obtained antibody eluate was concentrated using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 30,000; Millipore), and was applied onto a Superdex 200 column (26 mmID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS and eluted with the same buffer to give the antibody monomer fraction. It was passed through the ActiClean ETox column (25 mmID x 59 mm, Sterogene Bioseparations) equilibrated with PBS to remove endotoxin, followed by a concentration using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 10,000; Millipore), and the concentrate was further filtrated aseptically (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) to give the purified antibody. The purified antibody was named Nec1-554-1 SP3.

All of the purified antibodies thus obtained demonstrated purity of 95% or higher on SDS-PAGE and gel filtration HPLC using Superdex 200 column. The endotoxin content in the antibody preparation was found to be 0.1 EU/mg antibody or less by the analyses using both Endospecy ES-24S Set (Seikagaku Corp.) and Toxicolor DIA Set (Seikagaku Corp.).

REFERENCE EXAMPLE 29

Construction of animal cell expression vectors for nectin-1, nectin-3, nectin-4 and Necl-5

Human nectin-1 gene was obtained by performing PCR using Marathon-Ready cDNA (Takara Bio) of human brain as a template, primer 59 (SEQ ID NO: 59) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRV, and primer 60 (SEQ ID NO: 60) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the cDNA solution described above used as a template, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase

(STRATAGENE), 1 μM each of primer 59 (SEQ ID NO: 59) and primer 60 (SEQ ID NO: 60), 200 μM dNTPs and 2 μL of 10x Pfu Ultra Buffer (STRATAGENE) to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 3 minutes. The PCR product was purified using PCR Purification Kit (QIAGEN) and then digested with restriction enzymes EcoRV and XhoI. Similarly, pCMV-Tag4 (STRATAGENE) was digested with restriction enzymes EcoRV and XhoI. These DNA fragments were purified, respectively, using PCR Purification Kit and the two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio). The reaction mixture was transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in kanamycin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pCMV-Tag4-Nectin-1 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 61) encoding the nectin-1 protein (SEQ ID NO: 62) was obtained.

Human nectin-3 gene was obtained by performing PCR using the cDNA of human placenta contained in MTC Multiple Tissue cDNA Panels (Takara Bio) as a template, primer 47 (SEQ ID NO: 47) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII, and primer 63 (SEQ ID NO: 63) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRV. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the cDNA solution described above, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 47 (SEQ ID NO: 47) and primer 63 (SEQ ID NO: 63), 200 μM dNTPs and 10 μL of 2x GC Buffer I (TaKaRa Bio) to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minutes. The PCR product was purified using PCR Purification Kit and then digested with restriction enzymes HindIII and EcoRV. Similarly, pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was digested with restriction enzymes HindIII and EcoRV. These DNA fragments were purified, respectively, using PCR Purification Kit, and the two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2. The reaction mixture was transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-3 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 6) encoding the nectin-3 protein (SEQ ID NO: 5) was obtained. Using

pcDNA3.1(+)-Nectin-3 obtained herein as a template, PCR was carried out by using primer 47 (SEQ ID NO: 47) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII and primer 64 (SEQ ID NO: 64) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 100 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-3, 2.5 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 47 (SEQ ID NO: 47) and primer 64 (SEQ ID NO: 64), 200 μM dNTPs and 25 μL of 2x GC Buffer I to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 30 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2 minutes. The PCR product was purified using PCR Purification Kit and then digested with restriction enzymes HindIII and XhoI. Similarly, pCMV-Tag4 was digested with restriction enzymes HindIII and XhoI. These DNA fragments were purified, respectively, using MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN), and the two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2. The reaction mixture was transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in kanamycin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pCMV-Tag4-Nectin-3 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 6) encoding the nectin-3 protein (SEQ ID NO: 5) was obtained.

Human nectin-4 gene was obtained by performing PCR using Marathon-Ready cDNA (Takara Bio) of human lung as a template, primer 65 (SEQ ID NO: 65) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI, and primer 66 (SEQ ID NO: 66) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the cDNA solution described above, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 65 (SEQ ID NO: 65) and primer 66 (SEQ ID NO: 66), 200 μM dNTPs and 2 μL of 10x Pfu Ultra Buffer to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 3 minutes. Next, the PCR product was purified using PCR Purification Kit and then digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. Similarly, pCMV-Tag4 was digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. These DNA fragments were purified using PCR Purification Kit, and the insert DNA fragment and the vector fragment were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2. The reaction mixture was transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in kanamycin-containing LB agar

medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pCMV-Tag4-Nectin-4 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 67) encoding the nectin-4 protein (SEQ ID NO: 68) was obtained.

Human Necl-5 gene was obtained by performing PCR using as a template Marathon-Ready cDNA (Takara Bio) of human small intestine, primer 69 (SEQ ID NO: 69) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII, and primer 70 (SEQ ID NO: 70) tagged with the recognition site of restriction enzyme SalI. In this reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the cDNA solution above, 1 U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 69 (SEQ ID NO: 69) and primer 70 (SEQ ID NO: 70), 200 μM dNTPs and 2 μL of 10x Pfu Ultra Buffer to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 40 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 3 minutes. Next, the PCR product was purified on PCR Purification Kit and then ligated with pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). The reaction mixture was transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in kanamycin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the cloning vector pCR-BluntII-Necl-5 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 72) encoding the Necl-5 protein (SEQ ID NO: 71) was obtained. The pCR-BluntII-Necl-5 obtained herein was digested with restriction enzymes HindIII and SalI. Similarly, pCMV-Tag4 was digested with restriction enzymes HindIII and SalI. These DNA fragments were purified using MinElute PCR Purification Kit, and the two DNA fragments were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2. The reaction mixture was transfected to Escherichia coli TOP10, followed by incubation for selection in kanamycin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pCMV-Tag4-Necl-5 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 72) encoding the Necl-5 protein (SEQ ID NO: 71) was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 30

Construction of animal cell expression vector of Ig1 or Ig2 domain-deficient nectin-2 variant

The nectin-2 variant gene in which Ig1 domain or Ig2 domain in the

extracellular region of nectin-2 was deficient was obtained by the following procedure. PCR was carried out using pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ obtained in REFERENCE EXAMPLE 4 as a template. In the reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ described above, 1U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 1 μM each of primer 5 (SEQ ID NO: 15) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme EcoRI and primer 73 (SEQ ID NO: 73) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme EcoRV for Ig1 domain-deficient variant, or primer 5 (SEQ ID NO: 15) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme EcoRI and primer 74 (SEQ ID NO: 74) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme EcoRV for Ig2 domain-deficient variant, 200 μM dNTPs and 10 μL of 2x GC Buffer I (TaKaRa Bio), to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 30 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 1.5 minutes. The PCR product was purified using PCR Purification Kit (QIAGEN) and then digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. Similarly, pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) was digested with restriction enzymes EcoRI and EcoRV. These fragments were purified using PCR Purification Kit, and digested with the restriction enzymes. And after the vector fragment were ligated using DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio), the ligation product was transfected to Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), followed by an incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium to obtain plasmids pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg1-1 and pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg2-1 having the respective PCR fragments amplified above.

Next, PCR was performed using 10 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ as a template, 1U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 75 (SEQ ID NO: 75) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme EcoRV and primer 76 (SEQ ID NO: 76) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme XhoI for Ig1 domain-deficient variant, or primer 77 (SEQ ID NO: 77) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme EcoRV and primer 76 (SEQ ID NO: 76) tagged with the recognition sequence of restriction enzyme XhoI for Ig2 domain-deficient variant, 200 μM dNTPs and 10 μL of 2x GC Buffer I to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 30 times the cycle set to include 95°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 1.5 minutes. Next, the PCR product was purified using PCR Purification Kit and then digested with restriction enzymes EcoRV and XhoI.

Similarly, pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg1-1 and pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg2-1 constructed above were digested with restriction enzymes EcoRV and XhoI. These fragments were purified using PCR Purification Kit, and the restriction enzyme digests of the PCR product using primer 75 (SEQ ID NO: 75) and primer 76 (SEQ ID NO: 76) was ligated with the restriction enzyme digests of pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg1-1 using DNA Ligation Kit ver. 2. Likewise, the restriction enzyme digests of the PCR product using primer 77 (SEQ ID NO: 77) and primer 76 (SEQ ID NO: 76) was ligated with the restriction enzyme digests of pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg2-1 using DNA Ligation Kit ver. 2. They were transfected to Escherichia coli TOP10, followed byincubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium to give the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg1 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 79) encoding the nectin-2 Ig1 domain-deficient protein (SEQ ID NO: 78) and the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg2 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 81) encoding the nectin-2 Ig2 domain-deficient protein (SEQ ID NO: 80).

REFERENCE EXAMPLE 31

Cloning and base sequencing of cDNA encoding cynomolgus monkey nectin-2

A gene of cynomolgus monkey nectin-2 was obtained as follows. A cDNA library was prepared by a reverse transcription reaction using the TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) and about 1 μg of the total RNA (UNITECH) prepared from the testis of cynomolgus monkey as a template, in accordance with the protocol attached to the kit. Using the cDNA library as a template, PCR was performed using primer 82 (SEQ ID NO: 82) and primer 83 (SEQ ID NO: 83). In the reaction, the reaction solution was composed of the above cDNA corresponding to about 40 ng of the total RNA, 1U of Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE), 1 μM each of primer 82 (SEQ ID NO: 82) and primer 83 (SEQ ID NO: 83), 200 μM dNTPs and 2 μL of 10x Pfu Ultra Buffer to make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 96°C for 1 minute and then repeating 40 times the cycle set to include 96°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2.5 minutes. Next, using this PCR product as a template, PCR was performed using primer 84 (SEQ ID NO: 84) and primer 85 (SEQ ID NO: 85). In the reaction, the reaction solution was composed of 1 μL of the above PCR product, 1U of PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase, 1 μM each of primer 84 (SEQ ID NO: 84) and primer 85 (SEQ ID NO: 85), 200 μM dNTPs and 2 μL of 10x Pfu

Ultra Bufferto make the total 20 μL. PCR was carried out by reacting at 96°C for 1 minute and then repeating 40 times the cycle set to include 96°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 2.5 minutes. Next, the PCR product was purified using MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) and ligated with pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). The ligation product was transfected to Escherichia coli competent cell TOP10 (Invitrogen), followed by incubation for selection in kanamycin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the vector pCR-BluntII-maNectin-2 bearing the cDNA sequence (SEQ ID NO: 87) encoding the cynomolgus monkey nectin-2 protein (SEQ ID NO: 86) was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 32

Construction of animal cell expression vector for cynomolgus monkey nectin-2

Using the pCR-BluntII-maNectin-2 having the cynomolgus monkey nectin-2 gene prepared in REFERENCE EXAMPLE 31 as a template, PCR was carried out by using primer 88 (SEQ ID NO: 88) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 89 (SEQ ID NO: 89) tagged with the recognition site of restriction enzyme XhoI. In this reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pCR-BluntII-maNectin-2, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO), 0.3 μM each of primer 88 (SEQ ID NO: 88) and primer 89 (SEQ ID NO: 89), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Buffer (TOYOBO) to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 35 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute and 30 seconds. Next, the PCR product was purified using MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) and then digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI, followed by purification with MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN). Similarly, pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI. After separation by agarose electrophoresis, the vector fragment was purified using MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN). The insert DNA fragment and the vector fragment thus obtained were ligated using Ligation High (TOYOBO) and then transfected to Escherichia coli Competent High DH5α (TOYOBO), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-maNectin-2 having the cDNA sequence (SEQ ID NO: 87) encoding

the cynomolgus monkey nectin-2 protein (SEQ ID NO: 86) was obtained.

REFERENCE EXAMPLE 33

Construction of animal cell expression vector for human nectin-2 in which a cynomolgus monkey-type mutation was introduced

Using the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 4 as a template, PCR was carried out by using the pair of primer 90 (SEQ ID NO: 90) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII and primer 91 (SEQ ID NO: 91), or the pair of primer 92 (SEQ ID NO: 92) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 93 (SEQ ID NO: 93). In this reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO), 0.3 μM each of primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 91 (SEQ ID NO: 91), or primer 92 (SEQ ID NO: 92) and primer 93 (SEQ ID NO: 93), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Buffer (TOYOBO) to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 35 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. Next, the PCR products were purified using MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN). Next, using the mixture of the PCR products thus obtained as a template, PCR was carried out using primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 92 (SEQ ID NO: 92). In this reaction, the reaction solution was composed of 5 μL each of the purified PCR products described above, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase, 0.3 μM each of primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 92 (SEQ ID NO: 92), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Bufferto make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 20 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. Next, the PCR product was purified using MinElute PCR Purification Kit and then digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI, followed by purification with MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN). Similarly, pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI. After separation by agarose electrophoresis, the objective vector fragment was purified using MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN). The insert DNA fragment and the vector fragment were ligated using Ligation High (TOYOBO) and then transfected to Escherichia coli Competent High DH5α (TOYOBO), followed by incubation for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual clones recovered from the

grown colony of Escherichia coli, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2 (AN77-78PD) having a cDNA sequence encoding AN77-78PD with mutation of Ala to Pro at position 77 and Asn to Asp at position 78 in the human nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3) was obtained.

Next, the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 4 using as a template, PCR was performed by using the pair of primer 90 (SEQ ID NO: 90) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII and primer 94 (SEQ ID NO: 94), or the pair of primer 92 (SEQ ID NO: 2) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 95 (SEQ ID NO: 95). In this reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase, 0.3 μM each of primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 94 (SEQ ID NO: 94) or primer 92 (SEQ ID NO: 92) and primer 95 (SEQ ID NO: 95), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Buffer to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 35 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. Next, the PCR products were purified using MinElute PCR Purification Kit. Using the mixture of the PCR products thus obtained as a template, PCR was carried out using primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 92 (SEQ ID NO: 92). In this reaction, the reaction solution was composed of 5 μL each of the purified PCR products described above, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase, 0.3 μM each of primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 92 (SEQ ID NO: 92), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Buffer to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 20 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. Hereinafter, the same procedure as described above was performed to give the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2 (G113R) having a cDNA sequence encoding the protein G113R with mutation of Gly to Arg at position 113 in human nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3).

Next, using the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 4 as a template, PCR was performed by using the pair of primer 90 (SEQ ID NO: 90) tagged with the recognition site of restriction enzyme HindIII and primer 96 (SEQ ID NO: 96), or the pair of primer 92 (SEQ ID NO: 2) tagged with the recognition site of restriction enzyme EcoRI and primer 97 (SEQ ID NO: 97). In this reaction, the reaction solution was composed of 10 ng of pcDNA3.1(+)-Nectin-2δ, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase, 0.3 μM each of

primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 96 (SEQ ID NO: 96) or primer 96 (SEQ ID NO: 96) and primer 97 (SEQ ID NO: 97), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Buffer to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 35 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. Next, the PCR products were purified using MinElute PCR Purification Kit. Using the mixture of the PCR products thus obtained as a template, PCR was carried out using primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 92 (SEQ ID NO: 92). In this reaction, the reaction solution was composed of 5 μL each of the purified PCR products described above, 1 U of KOD-Plus-DNA Polymerase, 0.3 μM each of primer 90 (SEQ ID NO: 90) and primer 92 (SEQ ID NO: 92), 200 μM dNTPs and 5 μL of 10x PCR Buffer to make the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 95°C for 3 minutes and then repeating 20 times the cycle set to include 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. Hereinafter, the same procedure as described above was performed to give the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2 (H128R) having a cDNA sequence encoding the protein H128R with mutation of His to Arg at position 128 in human nectin-2δ protein (SEQ ID NO: 3).

REFERENCE EXAMPLE 34

Construction of animal cell expression vectors for human Nectin-2ED-Fc protein with a single amino acid substitution in the Ig1 domain

Using the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc prepared in REFERENCE EXAMPLE 15 as a template, the DNA sequence encoding 26 amino acid residues in the Ig1 domain of nectin-2 was mutated to replace each of the amino acid residues with alanine residue or glycine residue, by using Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). In the reaction, the reaction solution composed of 7 μL of the expression plasmid described above (20 ng/ μL), 35 μL of 10x Buffer, 7 μL of dNTP mix, 21 μL of Quick Solution and 7 μL of PfuTurbo DNA Polymerase (2.5U/μL) to make the total volume 300 μL by adding distilled water thereto. A 9 μL aliquot of the solution was separately dispensed into 26 tubes for PCR, to which each combination of 0.5 μL of the respective primers (3.7 μM) was added: primer Q37A (SEQ ID NO: 98) and primer Q37A R (SEQ ID NO: 99), primer P40G (SEQ ID NO: 100) and primer P40G R (SEQ ID NO: 101), primer Q45A (SEQ ID NO: 102) and primer Q45A R (SEQ ID NO: 103), primer H55A (SEQ ID NO: 104) and primer H55A R (SEQ ID NO: 105), primer V60A (SEQ ID

NO: 106) and primer V60A R (SEQ ID NO: 107), primer Y64A (SEQ ID NO: 108) and primer Y64A R (SEQ ID NO: 109), primer Q71A (SEQ ID NO: 110) and primer Q71A R (SEQ ID NO: 111), primer A75G (SEQ ID NO: 112) and primer A75G R (SEQ ID NO: 113), primer P76G (SEQ ID NO: 114) and primer P76G R (SEQ ID NO: 115), primer A77G (SEQ ID NO: 116) and primer A77G R (SEQ ID NO: 117), primer N78A (SEQ ID NO: 118) and primer N78A R (SEQ ID NO: 119), primer H79A (SEQ ID NO: 120) and primer H79A R (SEQ ID NO: 121), primer Q80A (SEQ ID NO: 122) and primer Q80A R (SEQ ID NO: 123), primer N81A (SEQ ID NO: 124) and primer N81A R (SEQ ID NO: 125), primer K88A (SEQ ID NO: 126) and primer K88A R (SEQ ID NO: 127), primer S95A (SEQ ID NO: 128) and primer S95A R (SEQ ID NO: 129), primer K109A (SEQ ID NO: 130) and primer K109A R (SEQ ID NO: 131), primer E117A (SEQ ID NO: 132) and primer E117A R (SEQ ID NO: 133), primer D122A (SEQ ID NO: 134) and primer D122A R (SEQ ID NO: 135), primer H128A (SEQ ID NO: 136) and primer H128A R (SEQ ID NO: 137), primer N137A (SEQ ID NO: 138) and primer N137A R (SEQ ID NO: 139), primer F145A (SEQ ID NO: 140) and primer F145A R (SEQ ID NO: 141), primer K147A (SEQ ID NO: 142) and primer K147A R (SEQ ID NO: 143), primer V150A (SEQ ID NO: 144) and primer V150A R (SEQ ID NO: 145), primer M153A (SEQ ID NO: 146) and primer M153A R (SEQ ID NO: 147), or, primer T154A (SEQ ID NO: 148) and primer T154A R (SEQ ID NO: 149). PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 18 times the cycle set to include 95°C for 50 seconds, 60°C for 50 seconds and 68°C for 7 minutes and 40 seconds, followed by reaction at 68°C for 7 minutes. After the reaction, 1 μL each of restriction enzyme DpnI (2U/μL) was added to 26 tubes of the PCR solution, followed by reacting them at 37°C for an hour. These reaction mixtures, 2 μL, were transfected to 20 μL of Escherichia coli XL10-Gold ultracompetent cells and incubated for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the following animal cell expression vectors were obtained, respectively: the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q37A) having a cDNA sequence encoding the protein Q37A with mutation of Gln to Ala at position 37 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (P40G) having a cDNA sequence encoding the protein P40G with mutation of Pro to Gly at position 40 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q45A) having a cDNA sequence encoding the

protein Q45A with mutation of Gln to Ala at position 45 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (H55A) having a cDNA sequence encoding the protein H55A with mutation of His to Ala at position 55 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (V60A) having a cDNA sequence encoding the protein V60A with mutation of Val to Ala at position 60 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Y64A) having a cDNA sequence encoding the protein Y64A with mutation of Tyr to Ala at position 64 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q71A) having a cDNA sequence encoding the protein Q71A with mutation of Gln to Ala at position 71 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (A75G) having a cDNA sequence encoding the protein A75G with mutation of Ala to Gly at position 75 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (P76G) having a cDNA sequence encoding the protein P76G with mutation of Pro to Gly at position 76 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (A77G) having a cDNA sequence encoding the protein A77G with mutation of Ala to Gly at position 77 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (N78A) having a cDNA sequence encoding the protein N78A with mutation of Asn to Ala at position 78 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (H79A) having a cDNA sequence encoding the protein H79A with mutation of His to Ala at position 79 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q80A) having a cDNA sequence encoding the protein Q80A with mutation of Gln to Ala at position 80 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (N81A) having a cDNA sequence encoding the protein N81A with mutation of Asn to Ala at position 81 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K88A) having a cDNA sequence encoding the protein K88A with mutation of Lys to Ala at position 88 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (S95A) having a cDNA sequence encoding the protein S95A with mutation of Ser to Ala at position 95 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K109A) having a cDNA sequence encoding the

protein K109A with mutation of Lys to Ala at position 109 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (E117A) having a cDNA sequence encoding the protein E117A with mutation of Glu to Ala at position 117 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (D122A) having a cDNA sequence encoding the protein D122A with mutation of Asp to Ala at position 122 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (H128A) having a cDNA sequence encoding the protein H128A with mutation of His to Ala at position 128 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (N137A) having a cDNA sequence encoding the protein N137A with mutation of Asn to Ala at position 137 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (F145A) having a cDNA sequence encoding the protein F145A with mutation of Phe to Ala at position 145 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K147A) having a cDNA sequence encoding the protein K147A with mutation of Lys to Ala at position 147 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (V150A) having a cDNA sequence encoding the protein V150A with mutation of Val to Ala at position 150 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (M153A) having a cDNA sequence encoding the protein M153A with mutation of Met to Ala at position 153 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (T154A) having a cDNA sequence encoding the protein T154A with mutation of Thr to Ala at position 154 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37).

REFERENCE EXAMPLE 35

Construction of animal cell expression vector for human Nectin-2ED-Fc protein with a single amino acid substitution in the Ig2 domain

Using the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc prepared in REFERENCE EXAMPLE 15 as a template, the DNA sequence encoding 13 amino acid residues in the Ig2 domain of nectin-2 were mutated to replace each of the amino acid residues with alanine residue or glycine residue, by using Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). In the reaction, the

reaction solution composed of 3.5 μL of the expression vector described above(20 ng/ μL), 17.5 μL of 10x Buffer, 3.5 μL of dNTP mix, 10.5 μL of Quick Solution and 3.5 μL of PfuTurbo DNA Polymerase (2.5U/μL) to make the total volume 150 μL by adding distilled water thereto. A 9 μL aliquot of the solution was separately dispensed into 13 tubes for PCR, to which each combination of 0.5 μL of the respective primers (3.7 μM) was added: primer Q165A (SEQ ID NO: 150) and primer Q165A R (SEQ ID NO: 151), primer K170A (SEQ ID NO: 152) and primer K170A R (SEQ ID NO: 153), primer F173A (SEQ ID NO: 154) and primer F173A R (SEQ ID NO: 155), primer P177G (SEQ ID NO: 156) and primer P177G R (SEQ ID NO: 157), primer I184A (SEQ ID NO: 158) and primer I184A R (SEQ ID NO: 159), primer K186A (SEQ ID NO: 160) and primer K186A R (SEQ ID NO: 161), primer L197A (SEQ ID NO: 162) and primer L197A R (SEQ ID NO: 163), primer W202A (SEQ ID NO: 164) and primer W202A R (SEQ ID NO: 165), primer E206A (SEQ ID NO: 166) and primer E206A R (SEQ ID NO: 167), primer T212A (SEQ ID NO: 168) and primer T212A R (SEQ ID NO: 169), primer T235A (SEQ ID NO: 170) and primer T235A R (SEQ ID NO: 171), primer K239A (SEQ ID NO: 172) and primer K239A R (SEQ ID NO: 173), or, primer A249G (SEQ ID NO: 174) and primer A249G R (SEQ ID NO: 175). PCR was carried out by reacting at 95°C for 1 minute and then repeating 18 times the cycle set to include 95°C for 50 seconds, 60°C for 50 seconds and 68°C for 7 minutes and 40 seconds, followed by reaction at 68°C for 7 minutes. After the reaction, 1 μL each of restriction enzyme DpnI (2U/μL) was added to 13 tubes of the PCR solution, followed by reacting them at 37°C for an hour. These reaction mixtures, 2 μL, were transfected to 20 μL of Escherichia coli XL10-Gold ultracompetent cells and incubated for selection in ampicillin-containing LB agar medium. As a result of sequencing of the individual gene clones recovered from the grown colony of Escherichia coli, the following animal cell expression vectors were obtained, respectively: the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q165A) having a cDNA sequence encoding the protein Q165A with mutation of Gln to Ala at position 165 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K170A) having a cDNA sequence encoding the protein K170A with mutation of Lys to Ala at position 170 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (F173A) having a cDNA sequence encoding the protein F173A with mutation of Phe to Ala at position 173 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector

pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (P177G) having a cDNA sequence encoding the protein P177G with mutation of Pro to Gly at position 177 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (I184A) having a cDNA sequence encoding the protein I184A with mutation of Ile to Ala at position 184 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K186A) having a cDNA sequence encoding the protein K186A with mutation of Lys to Ala at position 186 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (L197A) having a cDNA sequence encoding the protein L197A with mutation of Leu to Ala at position 197 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (W202A) having a cDNA sequence encoding the protein W202A with mutation of Trp to Ala at position 202 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (E206A) having a cDNA sequence encoding the protein E206A with mutation of Glu to Ala at position 206 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (T212A) having a cDNA sequence encoding the protein T212A with mutation of Thr to Ala at position 212 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (T235A) having a cDNA sequence encoding the protein T235A with mutation of Thr to Ala at position 235 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K239A) having a cDNA sequence encoding the protein K239A with mutation of Lys to Ala at position 239 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37), the animal cell expression vector pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (A249G) having a cDNA sequence encoding the protein A249G with mutation of Ala to Gly at position 249 in Nectin-2ED-Fc (SEQ ID NO: 37).

EXAMPLE 1

Generation of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

Each five KM mice (10 weeks old, 12 weeks old, male, Kirin Brewery) were immunized with an emulsion prepared by mixing the Nectin-2ED-Fc protein (1.6 mg/mL PBS solution) prepared in REFERENCE EXAMPLE 16 or the Nectin-2ED-FLAG protein (2 mg/mL PBS solution) prepared in REFERENCE EXAMPLE 13 with Freund's complete adjuvant (Difco) in equal volumes, subcutaneously and intracutaneously at 50 μg each/animal, respectively. For the

second and subsequent immunization, the emulsions prepared by mixing these recombinant nectin-2 extracellular domain proteins and Freund's incomplete adjuvant (Difco) in equal volumes were likewise given every 2 weeks as additional immunization.

Also, the FM3A cell line (#60-6) stably expressing nectin-2δ, which was established in REFERENCE EXAMPLE 19, and the NS0 cell line (#2-75) stably expressing nectin-2δ, which was established in REFERENCE EXAMPLE 18, were cutured in a flask, respectively. The cells were recovered by centrifugation (1,200 rpm x 5 minutes), resuspended in RPMI1640 medium (Invitrogen), and then recovered by centrifugation (1,200 rpm x 5 minutes), which procedure was repeated 3 times to remove the serum components. The respective cells recovered were resuspended in RPMI1640 medium at 5 x 10^7cells/mL, and a solution of mitomycin C (Wako Pure Chemical) in RPMI1640 medium in a final concentration of 20 μg/mL was added to the cells, followed by incubation at 37°C for 30 minutes. Both cell lines treated with mitomycin C were likewise washed 3 times with 10 mL of PBS and then resuspended in PBS at 2 x 10^7cells/mL. The suspension was intraperitoneally injected to each five KM mice (10-12 weeks old, male) repeatedly once every week.

Also, each five KM mice (12 weeks old, male) were immunized with an emulsion prepared by mixing the Nectin-2ED-Fc protein or the Nectin-2ED-FLAG protein with Freund's complete adjuvant (Difco) in equal volumes subcutaneously and intracutaneously at 50 μg each/animal, respectively. One week after the first immunization, mitomycin C-treated nectin-2δ expressing FM3A cell line (#60-6) was intraperitoneally given at 1 x 10^7 cells each/500 μL for booster. For the third immunization, an emulsion prepared by mixing Nectin-2ED-Fc or Nectin-2ED-FLAG and Freund's incomplete adjuvant in equal volumes was subcutaneously and intracutaneously administered at 50 μg/animal, respectively, and at the same time, mitomycin C-treated nectin-2δ expressing FM3A cell line (#60-6) was intraperitoneally injected at 1 x 10^7 cells each/500 μL, by the same procedure as described above. For the fourth and subsequent booster, the mitomycin C-treated nectin-2δ expressing FM3A cell line (#60-6) only was intraperitoneally injected at 1 x 10^7 cells each/500 μL, by the procedure described above.

Prior to the first immunization and one week after the third immunization, blood was collected from the ocular fundus of all mice under ethereal anesthesia to prepare antisera, and the antibody titer in the sera was determined by the flow

cystometry described below. That is, cell suspensions (PBS) of the CHO cell line (#43-2) stably expressing nectin-2δ, which was established in REFERENCE EXAMPLE 20, and mock-CHO cell line were separately dispensed in polypropylene tubes at 5 x 10^5 cells/tube, respectively, and then PBS was removed by centrifugation (1,200 rpm x 5 minutes). These cell debris were resuspended in 50 μL each of the mouse antisera diluted to 100-fold with PBS containing 1% BSA and 10% FBS, and reacted on ice in the dark for 30 minutes. After 200 μL of PBS was added to the cell debris and the mixture was centrifuged (1,200 rpm x 5 minutes), the supernatant was removed by aspiration. The cell debris were resuspended in 50 μL of a solution of anti-human IgG (H+L) Alexa 488 (Invitrogen) diluted to 100-fold with PBS containing 1% BSA and 10% FBS, and reacted on ice in the dark for 30 minutes. After the cell suspension was likewise washed 3 times with PBS, the cell debris was resuspended in 200 μL of PBS. Fluorescence intensities of the respective cells were analyzed with the flow cytometer MPL500 (BECKMAN COULTER) to prepare a graph having an abscissa representing the fluorescence intensity and an ordinate representing the cell count, whereby antibody titers of antisera were compared.

In the KM mice in which a sufficient increase in the serum antibody titer was confirmed, the mice immunized with Nectin-2ED-Fc or Nectin-2ED-FLAG were injected via tail vein with these protein antigens at a dose of 10 μg each/animal, and the mice immunized with the cell line stably expressing nectin-2δ were intraperitoneally injected with the same cell line at 1 x 10^7 cells each for final booster. Three days after the final booster, the mice were bled to death and spleen was withdrawn. The mouse spleen cells obtained were mixed in 5 : 1 with mouse myeloma cells (P3X63Ag8U.1 (P3U1)), which had previously been adapted to a medium in which 1 vial of 8-azaguanine (Sigma) per 500 mL of 10% FBS-supplemented Daigo T medium (a medium mixture of F-12 Nutrient Mixture (HAM) (Invitrogen) and Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen) in equal volumes, supplemented with MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Invitrogen), Sodium Pyruvate (Invitrogen) and L-Glutamine (Invitrogen)) thereby to cause fusion using polyethylene glycol (PEG) 1,500 (Roche Diagnostics). Cell fusion manipulations were performed according to the manual attached. The cells after fusion were resuspended in Daigo T medium supplemented with 10% FBS and 10% BM Condimed H1 (Roche Diagnostics), seeded on a 96-well culture plate at 5 x 10^4 spleen cells/100 μL/well and incubated at 37°C for a day in a 5% carbon dioxide gas

flow. Subsequently, Daigo T medium (HAT selection medium) supplemented with 0.1 mM hypoxanthine, 0.4 μM aminoputerine, 0.016 mM thymidine (HAT), 10% BM Condimed H1 and 10% FBS was added thereto at 100 μL/well, followed by a further incubation at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow with replacing twice 3/4 of the culture supernatant with a fresh HAT selection medium every 3 days.

The culture supernatant in which growth of the colony was observed during days 7 to 14 of the incubation was applied to Cell ELISA using the CHO cell line (#43-2) stably expressing nectin-2δ or the mock-CHO cell line, whereby an anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridoma was screened. In other words, the CHO cell line (#43-2) stably expressing nectin-2δ and the mock-CHO cell line were incubated in a 96-well tissue culture plate charged with GS-selection DMEM medium supplemented with 10% dialyzed FBS and GS supplement. After the culture supernatant of the plate where each cell line became confluent was removed by aspiration, 200 μL/well of PBS(+) supplemented with 2% FBS was added thereto and incubated on ice in the dark for an hour. After the supernatant of each well was removed by aspiration, 50 μL each/well of the hybridoma culture supernatant was added and reacted on ice in the dark for 2 hours. After this plate was washed once with PBS(+) chilled at 4°C, anti-human IgG (H+L) chain specific (GOAT) peroxidase conjugate (CALBIOCHEM) diluted to 3,000-fold with PBS(+) supplemented with 2% FBS was added by 100 μL each/well and reacted on ice in the dark for 2 hours. After the plate was washed 3 times with PBS(+) chilled at 4°C, a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution (SureBlue Microwell TMB peroxidase substrate; Kirkegaard & Perry Laboratories) was added by 100 μL each/well and maintained at room temperature for 5 minutes to cause color formation. By adding 2N sulfuric acid (Wako Pure Chemical) by 100 μL each/well, the enzyme reaction was terminated. Absorbance (450 nm) of each well was measured using a plate reader (Multiskan BICHROMATIC; Thermo Electron Co.), and those showing absorbance of 0.5 or more in the nectin-2 expression CHO cell line plate and showing absorbance of less than 0.3 in the mock-CHO cell line plate were judged to be positive wells. IgG antibody-producing hybridomas, whose antigenic specificity and affinity are expected to be particularly high, were selected from them. These hybridomas were resuspended in Daigo T medium supplemented with 10% FBS and 10% BM Condimed H1 and plated on a 96-well tissue culture plate at 0.5 cell/well. The culture supernatants of the hybridomas, which were confirmed to be monoclones by microscopic observation, were again screened by the

Cell ELISA described above to establish anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridoma clones. The thus obtained 256 anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridomas were incubated in flasks, respectively, charged with 100 mL of Daigo T medium supplemented with 10% FBS Ultra low IgG (Invitrogen), and the culture supernatants were centrifuged (1,200 rpm x 5 minutes) to give the supernatants containing monoclonal antibodies. After 200 μL of Protein A Sepharose FF (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Bio-sciences) equilibrated with PBS was added to these culture supernatants, the antibodies were adsorbed thereto while gently shaking overnight at 4°C. This protein A carrier was recovered by centrifugal operation and washed with PBS. Then, the IgG fraction was eluted with 1.2 mL of 0.1 M glycine-HCl (pH 3.0) containing 0.3 M NaCl. After this eluate was immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8.0), the buffer was replaced with PBS by ultraconcentration using ultrafiltration membrane (Vivaspin 6: molecular weight cut off = 10,000, Sartorius), which was used in the following *in vitro* characterizations as the anti-nectin-2 human monoclonal antibody preparation.

EXAMPLE 2

Binding activities of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

As the binding affinities of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies, the EC_{50} value of each antibody was determined by applying serial dilutions of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 with PBS(+) supplemented with 2% FBS to Cell ELISA using the nectin-2 stably expressed CHO cell line shown in EXAMPLE 1 and preparing a concentration-dependent curve, which were relatively assessed. The antigenic specificity of each monoclonal antibody was confirmed by comparing the binding property to the nectin-2 stable expression CHO cell line plate and the binding property to the mock-CHO cell line plate. The EC_{50} of respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies are collectively shown in TABLE 3.

EXAMPLE 3

Subclass of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

The subclass of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLE 1 were identified by ELISA shown below. Six antibodies (Anti-human IgG_1, Fc Fragment (Mouse), purified; CALBIOCHEM, Anti-human IgG_2, Fc

Fragment (Mouse), purified; CALBIOCHEM, Mouse Anti-Human IgG_3; Zymed, Ms x Hu IgG_4 Fc; CHEMICON, Monoclonal Mouse Anti-Human-IgM; Zymed, Goat anti-Human Kappa Light Chain Antibody b+f affinity purified; Bethyl) capable of specifically recognizing the H chain of human IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4 and IgM and human κ chain were diluted to a concentration of 2 μg/mL, respectively, in 50 mM sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 9.6). Each dilution was added to a 96-well half well immunoplate (Costar) at 50 μL each/well, followed by reacting at room temperature for 5 hours. After the reaction solution was removed from each well, 100 μL each /well of 25% Block Ace-containing distilled water (DAINIPPON PHARMACEUTICALS) was added for a blocking at 4°C overnight.

The thus prepared plate for ELISA was washed twice with PBS containing 0.05% Tween 20. Thereafter, each anti-nectin-2 human monoclonal antibody purified and obtained in EXAMPLE 1 was diluted to 1 μg/mL in 10% Block Ace-containing distilled water and 50 μL/well of the resulting dilution was added to the plate, followed by reacting at room temperature for 2 hours. After this plate was washed 4 times with PBS containing 0.05% Tween 20, Anti-IgG+IgA+IgM (H+L), Human, Goat, Horseradish Peroxidase (Zymed) diluted to 5,000-fold in 10% Block Ace-containing distilled water was added by 50 μL each/well, which was then reacted at room temperature for 2 hours. The plate was further washed 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20. After TMB solution (SureBlue Microwell TMB peroxidase substrate) was added by 50 μL each/well, the plate was maintained at room temperature for 2 minutes to cause color formation. Then, 2N sulfuric acid (Wako Pure Chemical) was added by 50 μL each/well to terminate the enzyme reaction. Absorbance (450 nm) of each well was measured using a plate reader (Multiskan BICHROMATIC) and the subclass of each antibody was identified from the antigen specificity of the antibody immobilized to the well showing a significantly higher absorbance than the others. The results are shown in TABLE 3A.

EXAMPLE 4

Grouping of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies based on epitopes

The anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLE 1 were grouped according to the difference in their recognition epitopes. Its process is shown below. To perform the competitive inhibition reaction between the antibodies, 187 anti-nectin-2 human monoclonal antibodies in the antibodies

obtained in EXAMPLE 1 were biotinylated. That is, 10 μg of the anti-nectin-2 human monoclonal antibody was added to 50 μL of WS Buffer attached to Biotin Labeling Kit-NH2 (Dojindo) and the mixture was ultraconcentrated almost to dryness using Microcon YM50 (MILLIPORE). To the liquid residue, 50 μL of Reaction Buffer attached to Biotin Labeling Kit-NH2 and a solution of 4 μL of NH2 Reactive Biotin in 50 μL of DMSO were added sequentially in this order. The mixture was reacted at 37°C for 10 minutes. The reaction mixture was again ultraconcentrated for buffer replacement with WS Buffer to give biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibodies. These antibodies were used for the assay described below. To FMAT plate (384 well plate Black/Clear Bottom with Lid; Applied Biosystems), 5 μL of a 2% FBS-supplemented PBS solution (25 μg/mL) of the anti-nectin-2 human monoclonal antibody obtained in EXAMPLE 1, 15 μL of a 2% FBS-supplemented PBS suspension (2 x 10^5 cells/mL) of the CHO cell line stably expression nectin-2δ and 5 μL of Streptavidin-Alexa Fluor 647 conjugate (Invitrogen) were added and mixed with each other, followed by reacting them at room temperature for 10 minutes. After 5 μL of a 2% FBS-supplemented PBS solution (0.5 μg/mL) of the biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibody prepared by the procedure described above was added to each well, the plate was incubated at room temperature for 60 minutes. For control runs, wells in which 2% FBS-supplemented PBS was added in place of the solution unlabeled anti-nectin-2 monoclonal antibody were provided. This competitive inhibition reaction were examined with the all combinations of the antibodies provided for the biotinylation. This plate was set on the Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems) to measure the fluorescence intensity of each well. The competitive inhibition rate in the combination of each anti-nectin-2 human monoclonal antibody was calculated according to the formula shown below.

Competitive inhibition rate = (1-A/B) x 100

A: Total FL1 value of well in which unlabeled antibody is added

B: Total FL1 value of well in which unlabeled antibody is not added

The inhibition rate obtained by this formula for all the combination of respective antibodies were analyzed using multivariable analysis software SpotFire DecisionSite for Lead Discovery (Spotfire). Based on the tree diagram thus obtained, the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies were grouped by epitopes.

As a result, the antibodies were classified into those belonging to seven big groups I through VII and the antibodies unaffiliated with any groups. Epitope groups of each nectin-2 human monoclonal antibody are collectively shown in TABLE 4.

EXAMPLE 5

Nectin-2-nectin-3 trans-binding inhibitory activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

It is known that nectin-2 heterophilically trans-interacts with nectin-3. Nectin-2-nectin-3 trans-binding inhibitory activity of the respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLE 1 was quantitatively assessed by the Biacore assay (Biacore 2000; Biacore, which name was changed to GE Healthcare) described below. Sensor chip CM5 (Biacore, which name was changed to GE Healthcare) was mounted on Biacore 2000 and the Nectin-3ED-Fc protein-immobilized chips were prepared by the following procedure. That is, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), attached to Amine Coupling Kit (Biacore, which name was changed to GE Healthcare), were dissolved in distilled water, and the resulting solutions were mixed by 100 μL each in equal volumes. Using HBS-EP buffer (Biacore, which name was changed to GE Healthcare) as a running buffer, the solution mixture was passed through the sensor chip at a flow rate of 10 μL/min. for 7 minutes. Thereafter, Nectin-3ED-mFc (1 mg/mL PBS solution) prepared in REFERENCE EXAMPLE 22 was diluted to 160 μg/mL in 10 mM acetate buffer (pH 5.0) (Biacore, which name was changed to GE Healthcare) and the dilution was passed through the sensor chip at a flow rate of 10 μL/min. for 7 minutes to immobilize the protein on the chip. Subsequently, the ethanolamine solution attached to the same kit was passed through the sensor chip at a flow rate of 10 μL/min. for 7 minutes to block the remaining active NHS groups. Furthermore, 10 mM NaOH was passed through to wash the sensor chip at a flow rate of 10 μL/min. for 1 minute. An equivolume mixture of the Nectin-2ED-hFc protein solution (80 μg/mL HBS-EP buffer) and the anti-nectin-2 human monoclonal antibody solution or control human antibody solution (Human IgG Whole Molecule Chrom Pure; Jackson ImmunoResearch Laboratories) (60 μg/mL HBS-EP buffer) was passed through the thus prepared Nectin-3ED-mFc protein-immobilized sensor chip at a flow rate of 20 μL/min. for 2 minutes. Changes in response were recorded and the nectin 2-nectin-3 trans-binding inhibition rate was calculated according to the formula

described below.

Nectin 2-nectin 3 trans-binding inhibition rate (%) = (A-B) x 100/A

A: Response when control antibody was used

B: Response when the anti-nectin-2 human monoclonal antibody was used

The nectin 2-nectin 3 trans-binding inhibitory activities of the respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies are collectively shown in TABLE 5.

EXAMPLE 6

Cell growth inhibitory activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies against OV-90 human ovarian cancer cell line

The *in vitro* growth inhibitory activity of respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLE 1 against human OV-90 ovarian cancer cell line was assayed by the method described below. For culture of the OV-90 cell line, an equivolume medium mixture of MCDB105 (Sigma) and Medium 199 (Sigma), supplemented with 15% FBS (JRH) was used. The cells were seeded in a 10 cm tissue culture Petri dish (Becton Dickinson) at a cell density of 4.5 x 10^5/dish every other day and incubated for subculture at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. The OV-90 cell line was detached from the Petri dish by treating with 400 U of Collagenase N-2 (Nitta Gelatin) at 37°C for 2 minutes, followed by further treatment with 2 mL of Cell Dissociation Buffer (Invitrogen) at 37°C for 15 minutes. The cell suspension thus obtained was centrifuged (1000 rpm, 3 minutes) and the recovered cells were resuspended in an equivolume medium mixture of MCDB105 and Medium 199, supplemented with 1% FBS at a density of 3 x 10^4 cells/mL.

The solutions of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLE 1, the anti-nectin-2 polyclonal antibody (N2-No. 1) prepared in REFERENCE EXAMPLE 14 and control human antibody (Human IgG Whole molecule Chrom Pure; Jackson ImmunoResearch Laboratories) in PBS, which were prepared to be 300 μg/mL, or PBS was added to a 96-well culture plate (Becton Dickinson) by 10 μL each/well, and the OV-90 cell suspension described above was added by 100 μL each/well. In addition, for measurement of the background level for calculation of the cell growth inhibition rate described below, wells containing 100 μL of the same medium and 10 μL of PBS were prepared. After incubating the plate at 37°C for 6 days in a 5% carbon dioxide gas flow, a WST-8 solution (Cell

Counting Kit-8; Dojindo) as a cell growth assay reagent was added by 10 μL each/well. After the plate was incubated at 37°C for an hour in a 5% carbon dioxide gas flow, absorbance (450 nm) of each well resulting from the formazan produced was measured with a plate reader (Multiskan BICHROMATIC) and the OV-90 cell line growth inhibition rate was calculated according to the formula below.

Cell growth inhibition rate = [(A-B)-(C-B)] x 100/(A-B)

A: Absorbance of the well to which control human antibody was added

B: Absorbance of the well to which PBS is added (OV90 cell line is not added)

C: Absorbance of the well to which the anti-nectin-2 human monoclonal antibody or the anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody

In the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained, some antibodies showed a strong cell growth inhibitory activity or a weak cell growth inhibitory activity against the OV-90 cell line. Moreover, the anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody (N2-No. 1) exhibited about 10% of growth inhibitory activity against the OV-90 cell line at the final concentration of 30 μg/mL. The *in vitro* OV-90 cell line growth inhibition rates of respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies (final concentration of 30 μg/mL) are collectively shown in TABLE 6.

The 30 antibodies which showed a relatively strong *in vitro* OV-90 cell line growth inhibitory activity in the primary screening described above were again prepared by incubation of the respective hybridomas, followed by purifications with Protein A column chromatography and gel filtration HPLC. Using the resulting highly purified antibody samples, the concentration-dependent (100, 30, 10, 3, 1, 0.3 and 0.03 μg/mL) cell growth inhibitory activity against the OV-90 cell line was assayed by the procedure described above. As a result, eight anti-nectin-2 human monoclonal antibodies (Nec1-803-2, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-845-2, Nec1-834-1, Nec1-244-3, Nec1-303-2 and Nec1-903-1) were selected as exhibiting the strong OV-90 cell line growth inhibitory activity concentration-dependently with good reproductivity. These antibodies exhibited the same activity even when the OV-90 cell line was engrafted on a 96-well cell culture plate followed by addition of the antibody solution thereto. The OV-90 cell line growth inhibitory activity of the eight anti-nectin-2 human monoclonal antibodies described above is collectively shown in TABLE 7.

TABLE 3

name	EC50 nM	name	EC50 nM	name	EC50 nM
Nec1-102-1	0.44	Nec1-555-5	1.46	Nec1-1142-1	4.45
Nec1-103-1	0.13	Nec1-568-1	0.62	Nec1-1150-2	0.69
Nec1-105-1	1.78	Nec1-608-1	0.60	Nec1-1163-2	0.98
Nec1-108-2	2.46	Nec1-610-2	0.29	Nec1-1202-5	0.71
Nec1-111-3	0.51	Nec1-614-5	0.95	Nec1-1203-1	0.49
Nec1-119-1	0.17	Nec1-631-10	0.91	Nec1-1204-4	10.77
Nec1-124-2	0.90	Nec1-704-1	9.91	Nec1-1209-8	0.96
Nec1-133-2	0.75	Nec1-716-6	0.66	Nec1-1212-7	0.63
Nec1-141-3	1.36	Nec1-718-2	2.15	Nec1-1214-5	0.82
Nec1-144-1	10.95	Nec1-726-1	2.07	Nec1-1216-1	1.02
Nec1-145-2	0.16	Nec1-730-4	0.54	Nec1-1218-3	7.22
Nec1-202-1	0.37	Nec1-738-2	0.39	Nec1-1232-2	0.43
Nec1-205-1	0.48	Nec1-740-2	0.81	Nec1-1234-1	0.95
Nec1-206-2	0.92	Nec1-749-1	3.62	Nec1-1236-1	1.64
Nec1-208-1	0.51	Nec1-755-5	0.40	Nec1-1239-2	1.33
Nec1-209-2	0.26	Nec1-758-8	11.85	Nec1-1302-2	0.53
Nec1-213-2	9.06	Nec1-759-9	0.33	Nec1-1314-3	85.64
Nec1-215-3	1.19	Nec1-765-1	2.68	Nec2-1409-12	5.08
Nec1-217-2	5.40	Nec1-769-2	0.16	Nec2-1411-1	17.31
Nec1-226-3	0.29	Nec1-773-7	0.36	Nec2-1422-1	47.54
Nec1-231-1	3.92	Nec1-803-2	0.23	Nec2-1613-3	1.69
Nec1-233-1	2.35	Nec1-812-4	1.86	Nec2-1625-4	0.35
Nec1-235-1	2.07	Nec1-815-1	0.46	Nec2-1633-4	0.63
Nec1-244-3	6.49	Nec1-818-4	2.18	Nec3-1829-2	8.01
Nec1-259-1	0.13	Nec1-819-2	0.68	Nec3-1907-1	0.26
Nec1-301-2	1.62	Nec1-821-3	1.74	Nec3-1908-4	1.11
Nec1-302-1	2.49	Nec1-831-4	4.26	Nec3-1927-3	0.96
Nec1-303-2	26.77	Nec1-834-1	5.74	Nec3-1932-1	0.71
Nec1-304-2	0.16	Nec1-835-1	3.38	Nec3-2006-1	1.57
Nec1-308-2	0.36	Nec1-842-2	0.80	Nec3-2025-3	0.41
Nec1-311-2	1.35	Nec1-843-1	0.46	Nec3-2036-6	0.45
Nec1-313-1	0.47	Nec1-845-2	0.53	Nec3-2109-2	1.08
Nec1-316-1	0.80	Nec1-847-2	0.50	Nec3-2123-1	1.60
Nec1-319-2	0.17	Nec1-868-7	0.59	Nec3-2134-1	0.72
Nec1-320-1	1.46	Nec1-869-6	0.59	Nec3-2213-1	1.21
Nec1-322-5	0.17	Nec1-878-1	1.56	Nec5-326-1	0.54
Nec1-326-7	2.33	Nec1-888-11	4.42	Nec5-532-1	4.61
Nec1-332-1	2.07	Nec1-903-1	0.21	Nec5-617-7	1.60
Nec1-333-1	1.78	Nec1-907-1	0.22	Nec5-1906-6	0.41
Nec1-336-2	0.14	Nec1-908-2	1.41	Nec5-2309-1	0.37
Nec1-338-1	0.61	Nec1-909-1	1.25	Nec6-151-4	0.82
Nec1-341-10	7.95	Nec1-914-1	0.19	Nec6-505-2	0.47
Nec1-349-1	0.29	Nec1-917-2	0.18	Nec6-940-7	3.10
Nec1-372-2	0.19	Nec1-918-2	22.64	Nec6-947-4	1.31
Nec1-410-3	0.67	Nec1-919-1	0.37	Nec8-3330-1	0.61
Nec1-411-1	0.66	Nec1-920-1	0.79	Nec8-3350-1	0.33
Nec1-416-1	1.00	Nec1-927-14	0.53	Nec8-3410-1	0.34
Nec1-427-2	0.35	Nec1-928-1	0.23	Nec8-3424-1	1.05
Nec1-428-1	0.58	Nec1-929-2	0.71	Nec8-3517-11	0.25
Nec1-445-4	1.41	Nec1-930-1	4.05	Nec8-3523-2	0.51
Nec1-458-6	3.39	Nec1-938-1	3.73	Nec8-3524-14	0.30
Nec1-460-1	4.42	Nec1-938-2	2.09	Nec8-3669-4	0.50
Nec1-464-1	3.92	Nec1-940-1	2.21	Nec8-3704-7	0.88
Nec1-470-2	1.75	Nec1-948-3	1.31	Nec8-3717-4	0.96
Nec1-501-1	0.33	Nec1-964-1	0.36	Nec8-3723-3	0.25
Nec1-503-8	0.42	Nec1-1004-2	0.69	Nec8-3734-1	0.38
Nec1-505-3	117.40	Nec1-1005-2	2.32	Nec8-3806-2	1.32
Nec1-506-1	0.73	Nec1-1008-1	10.97	Nec8-3814-17	0.19
Nec1-507-1	0.27	Nec1-1012-1	0.12	Nec8-3823-5	0.40
Nec1-508-2	0.56	Nec1-1020-1	0.60	Nec8-3833-6	0.87
Nec1-520-1	0.39	Nec1-1021-1	0.27	Nec8-3941-4	0.45
Nec1-521-3	10.60	Nec1-1036-5	1.59	Nec8-4024-5	0.47
Nec1-522-2	1.00	Nec1-1039-3	0.72	Nec8-4111-2	0.20
Nec1-526-1	0.27	Nec1-1044-4	2.05	Nec8-4116-8	0.36
Nec1-528-2	0.62	Nec1-1085-1	7.70	Nec8-4144-2	0.28
Nec1-530-1	0.79	Nec1-1115-2	0.71	Nec8-4188-1	0.98
Nec1-538-3	1.10	Nec1-1128-1	0.87	Nec8-4244-8	0.48
Nec1-546-5	1.56	Nec1-1132-2	1.58	Nec8-4315-1	0.78
Nec1-549-4	0.38	Nec1-1138-1	4.07	Nec8-4324-5	0.29
Nec1-554-1	1.11	Nec1-1139-1	0.58		

TABLE 3A

Name	subtype H chain/L chain
Nec1-102-1	G1/k
Nec1-103-1	G1/k
Nec1-105-1	G2/k
Nec1-108-2	G1/k
Nec1-111-3	G1/k
Nec1-119-1	G1/k
Nec1-124-2	G1/k
Nec1-133-2	G4/k
Nec1-141-3	G1/k
Nec1-144-1	G1/k
Nec1-145-2	G1/k
Nec1-202-1	G1/k
Nec1-205-1	G1/k
Nec1-206-2	G1/k
Nec1-208-1	G1/k
Nec1-209-2	G1/k
Nec1-213-2	G1/k
Nec1-215-3	G1/k
Nec1-217-2	G1/k
Nec1-231-1	G1/k
Nec1-235-1	G4/k
Nec1-244-3	G1/k
Nec1-259-1	G1/k
Nec1-301-2	G1/k
Nec1-302-1	G1/k
Nec1-303-2	G1/k
Nec1-304-2	G1/k
Nec1-308-2	G1/k
Nec1-313-1	G1/k

name	subtype H chain/L chain
Nec1-555-5	G4/k
Nec1-568-1	G1/k
Nec1-608-1	G1/k
Nec1-610-2	G1/k
Nec1-614-5	G1/k
Nec1-631-10	G2/k
Nec1-704-1	G1/k
Nec1-716-6	G1/k
Nec1-718-2	G1/k
Nec1-726-1	G1/k
Nec1-730-4	G1/k
Nec1-738-2	G1/k
Nec1-740-2	G1/k
Nec1-755-5	G1/k
Nec1-758-8	G1/k
Nec1-759-9	G2/k
Nec1-765-1	G2/k
Nec1-769-2	G1/k
Nec1-773-7	G4/k
Nec1-803-3	G1/k
Nec1-812-4	G1/k
Nec1-815-1	G1/k
Nec1-818-4	G2/k
Nec1-819-2	G1/k
Nec1-821-3	G1/k
Nec1-831-4	G1/k
Nec1-834-1	G1/k
Nec1-835-1	G1/k
Nec1-842-2	G1/k

name	subtype H chain/L chain
Nec1-1138-1	G1/k
Nec1-1139-1	G4/k
Nec1-1142-1	G4/k
Nec1-1150-2	G1/k
Nec1-1163-2	G1/k
Nec1-1202-5	G1/k
Nec1-1203-1	G1/k
Nec1-1204-4	G1/k
Nec1-1209-8	G1/k
Nec1-1212-7	G4/k
Nec1-1214-5	G1/k
Nec1-1216-1	G1/k
Nec1-1218-7	G2/k
Nec1-1232-2	G1/k
Nec1-1234-1	G1/k
Nec1-1236-1	G1/k
Nec1-1239-2	G1/k
Nec1-1302-2	G1/k
Nec1-1305-1	G1/k
Nec1-1314-3	G2/k
Nec2-1409-12	G1/k
Nec2-1411-1	G1/k
Nec2-1422-1	G4/k
Nec2-1613-3	G2/k
Nec2-1625-4	G4/k
Nec2-1633-4	G1/k
Nec3-1829-2	G4/k
Nec3-1907-1	G4/k
Nec3-1908-4	G1/k

Nec1-316-1	G1/k
Nec1-319-2	G1/k
Nec1-320-1	G1/k
Nec1-322-5	G1/k
Nec1-326-7	G1/k
Nec1-332-1	G1/k
Nec1-333-1	G1/k
Nec1-336-2	G4/k
Nec1-338-1	G2/k
Nec1-341-10	G1/k
Nec1-349-1	G1/k
Nec1-411-1	G4/k
Nec1-416-1	G2/k
Nec1-427-2	G4/k
Nec1-428-1	G1/k
Nec1-445-4	G1/k
Nec1-458-6	G1/k
Nec1-460-1	G4/k
Nec1-464-1	G1/k
Nec1-470-2	G1/k
Nec1-501-1	G4/k
Nec1-503-8	G4/k
Nec1-505-3	G2/k
Nec1-506-1	G1/k
Nec1-507-1	G1/k
Nec1-508-2	G4/k
Nec1-520-1	G1/k
Nec1-522-2	G2/k
Nec1-526-1	G4/k
Nec1-528-2	G1/k
Nec1-530-2	G1/k
Nec1-538-3	G2/k
Nec1-546-5	G1/k
Nec1-549-4	G4/k

Nec1-843-1	G1/k
Nec1-845-2	G1/k
Nec1-847-2	G1/k
Nec1-868-7	G4/k
Nec1-869-6	G1/k
Nec1-878-1	G1/k
Nec1-888-11	G1/k
Nec1-903-1	G1/k
Nec1-907-1	G1/k
Nec1-908-2	G1/k
Nec1-909-1	G1/k
Nec1-914-1	G1/k
Nec1-917-2	G1/k
Nec1-918-2	G1/k
Nec1-919-1	G1/k
Nec1-920-1	G1/k
Nec1-927-14	G4/k
Nec1-930-1	G1/k
Nec1-938-2	G1/k
Nec1-940-2	G1/k
Nec1-948-3	G1/k
Nec1-964-1	G1/k
Nec1-1004-2	G1/k
Nec1-1005-2	G4/k
Nec1-1008-1	G4/k
Nec1-1012-1	G2/k
Nec1-1020-1	G4/k
Nec1-1021-2	G1/k
Nec1-1036-5	G1/k
Nec1-1039-3	G1/k
Nec1-1044-4	G1/k
Nec1-1085-1	G1/k
Nec1-1115-2	G1/k
Nec1-1132-2	G1/k

Nec3-1927-3	G4/k
Nec3-1932-1	G4/k
Nec3-2006-1	G1/k
Nec3-2025-3	G1/k
Nec3-2036-6	G1/k
Nec3-2109-2	G2/k
Nec3-2123-1	G1/k
Nec3-2134-1	G4/k
Nec3-2213-1	G1/k
Nec5-323-2	G4/k
Nec5-326-1	G2/k
Nec5-532-1	G1/k
Nec5-617-7	G4/k
Nec5-2309-7	G2/k
Nec6-505-2	G4/k
Nec6-940-7	G4/k
Nec8-3350-1	G4/k
Nec8-3410-1	G1/k
Nec8-3517-11	G1/k
Nec8-3523-3	G1/k
Nec8-3524-14	G1/k
Nec8-3669-4	G1/k
Nec8-3704-7	G1/k
Nec8-3717-4	G4/k
Nec8-3723-3	G1/k
Nec8-3734-1	G2/k
Nec8-3806-2	G2/k
Nec8-3814-17	G1/k
Nec8-3823-5	G1/k
Nec8-3833-6	G4/k
Nec8-4024-5	G1/k
Nec8-4116-8	G1/k
Nec8-4144-2	G4/k
Nec8-4188-1	G4/k

Nec1-554-1	G1/k

TABLE 4

name	epitope	name	epitope	name	epitope
Nec1-102-1	VI	Nec1-555-5	IV	Nec1-1142-1	IV
Nec1-103-1	VII	Nec1-568-1	VII	Nec1-1150-2	VI
Nec1-105-1	VI	Nec1-608-1	VII	Nec1-1163-2	VI
Nec1-108-2	VII	Nec1-610-2	V	Nec1-1202-5	V
Nec1-111-3	VI	Nec1-614-5	VII	Nec1-1203-1	I
Nec1-119-1	VII	Nec1-631-10	V	Nec1-1204-4	I
Nec1-124-2	VII	Nec1-704-1	VI	Nec1-1209-8	I
Nec1-133-2	V	Nec1-716-6	V	Nec1-1212-7	VII
Nec1-141-3	VI	Nec1-718-2	V	Nec1-1214-5	VI
Nec1-144-1	VI	Nec1-726-1	IV	Nec1-1216-1	V
Nec1-145-2	VII	Nec1-730-4	VI	Nec1-1218-7	IV
Nec1-202-1	I	Nec1-738-2	VI	Nec1-1232-2	VII
Nec1-205-1	V	Nec1-740-2	V	Nec1-1234-1	I
Nec1-206-2	VII	Nec1-749-1	ND	Nec1-1236-1	IV
Nec1-208-1	V	Nec1-755-5	VI	Nec1-1239-2	IV
Nec1-209-2	VI	Nec1-758-8	II	Nec1-1302-2	IV
Nec1-213-2	III	Nec1-759-9	VI	Nec1-1305-1	V
Nec1-215-3	IV	Nec1-765-1	VI	Nec1-1314-3	VI
Nec1-217-2	III	Nec1-769-2	V	Nec2-1409-12	IV
Nec1-226-3	V	Nec1-773-7	VII	Nec2-1411-1	ND
Nec1-231-1	IV	Nec1-803-2	VI	Nec2-1422-1	ND
Nec1-233-1	ND	Nec1-812-4	IV	Nec2-1613-3	IV
Nec1-235-1	V	Nec1-815-1	VII	Nec2-1625-4	VI
Nec1-244-3	VI	Nec1-818-4	VI	Nec2-1633-4	VII
Nec1-259-1	VI	Nec1-819-2	VII	Nec3-1829-2	VI
Nec1-301-2	V	Nec1-821-3	I	Nec3-1907-1	V
Nec1-302-1	I	Nec1-831-4	IV	Nec3-1908-4	VI
Nec1-303-2	IV	Nec1-834-1	VI	Nec3-1927-3	V
Nec1-304-2	VII	Nec1-835-1	IV	Nec3-1932-1	V
Nec1-308-2	VII	Nec1-842-2	I	Nec3-2006-1	VII
Nec1-311-2	ND	Nec1-843-1	VI	Nec3-2025-3	V
Nec1-313-1	VI	Nec1-845-2	VI	Nec3-2036-6	VII
Nec1-316-1	VI	Nec1-847-2	VI	Nec3-2109-2	V
Nec1-319-2	VI	Nec1-868-7	VII	Nec3-2123-1	V
Nec1-320-1	I	Nec1-869-6	VI	Nec3-2134-1	VII
Nec1-322-5	V	Nec1-878-1	V	Nec3-2213-1	V
Nec1-326-7	IV	Nec1-888-11	III	Nec5-326-1	V
Nec1-332-1	VI	Nec1-903-1	VI	Nec5-532-1	IV
Nec1-333-1	IV	Nec1-907-1	VII	Nec5-617-7	VII
Nec1-336-2	VII	Nec1-908-2	VII	Nec5-1906-6	I
Nec1-338-1	VII	Nec1-909-1	VI	Nec5-2309-7	I
Nec1-341-10	IV	Nec1-914-1	VII	Nec6-151-4	ND
Nec1-349-1	VII	Nec1-917-2	VII	Nec6-505-2	VI
Nec1-372-2	V	Nec1-918-2	VI	Nec6-940-7	IV
Nec1-410-3	ND	Nec1-919-1	V	Nec6-947-4	ND
Nec1-411-1	VII	Nec1-920-1	V	Nec8-3734-1	I
Nec1-416-1	I	Nec1-927-14	VII	Nec8-3330-1	V
Nec1-427-2	VII	Nec1-928-1	V	Nec8-3350-1	VII
Nec1-428-1	V	Nec1-929-2	V	Nec8-3410-1	VII
Nec1-445-4	IV	Nec1-930-1	III	Nec8-3424-1	V
Nec1-458-6	IV	Nec1-938-1	ND	Nec8-3517-11	VII
Nec1-460-1	II	Nec1-938-2	III	Nec8-3523-3	V
Nec1-464-1	II	Nec1-940-2	IV	Nec8-3524-14	VII
Nec1-470-2	IV	Nec1-948-3	VI	Nec8-3669-4	VII
Nec1-501-1	VII	Nec1-964-1	I	Nec8-3704-7	VII
Nec1-503-8	VII	Nec1-1004-2	V	Nec8-3717-4	V
Nec1-505-3	VI	Nec1-1005-2	IV	Nec8-3723-3	VII
Nec1-506-1	V	Nec1-1008-1	IV	Nec8-3806-2	VII
Nec1-507-1	V	Nec1-1012-1	V	Nec8-3814-17	VII
Nec1-508-2	VI	Nec1-1020-1	VII	Nec8-3823-5	V
Nec1-520-1	VI	Nec1-1021-2	V	Nec8-3833-6	VII
Nec1-521-3	ND	Nec1-1036-5	I	Nec8-3941-4	VI
Nec1-522-2	VI	Nec1-1039-3	I	Nec8-4024-5	VI
Nec1-526-1	VII	Nec1-1044-4	IV	Nec8-4111-2	V
Nec1-528-2	V	Nec1-1085-1	II	Nec8-4116-8	VII
Nec1-530-1	VI	Nec1-1115-2	I	Nec8-4144-2	VII
Nec1-538-3	VI	Nec1-1128-1	ND	Nec8-4188-1	VII
Nec1-546-5	V	Nec1-1132-2	V	Nec8-4244-8	V
Nec1-549-4	VII	Nec1-1138-1	IV	Nec8-4315-1	V
Nec1-554-1	IV	Nec1-1139-1	VII	Nec8-4324-5	V

159

TABLE 5

name	trans binding inhibition (%)
Nec1-102-1	31
Nec1-111-3	44
Nec1-209-2	88
Nec1-244-3	35
Nec1-303-2	6
Nec1-313-1	12
Nec1-316-1	56
Nec1-319-2	70
Nec1-332-1	93
Nec1-505-3	8
Nec1-506-1	83
Nec1-508-2	92
Nec1-530-1	36
Nec1-704-1	23
Nec1-730-4	43
Nec1-738-2	79
Nec1-755-5	84
Nec1-765-1	5

name	trans binding inhibition (%)
Nec1-803-2	91
Nec1-818-4	97
Nec1-834-1	86
Nec1-843-1	89
Nec1-845-2	86
Nec1-869-6	80
Nec1-903-1	85
Nec1-918-2	73
Nec1-1115-2	13
Nec1-1128-1	23
Nec1-1150-2	82
Nec1-1209-8	8
Nec1-1214-5	6
Nec3-2025-3	91
Nec5-323-2	60
Nec6-505-2	86
Nec8-4024-5	93

TABLE 6

name	growth inhibition mean(%) (vs OV-90)
Nec1-102-1	6.7
Nec1-141-3	11.2
Nec1-144-1	9.9
Nec1-209-2	9.7
Nec1-244-3	16.7
Nec1-259-1	12.4
Nec1-303-2	18.4
Nec1-311-2	12.3
Nec1-313-1	7.1
Nec1-316-1	13.5
Nec1-319-2	12.9
Nec1-332-1	8.4
Nec1-505-3	9.8
Nec1-508-2	6.2
Nec1-520-1	10.0
Nec1-530-1	16.9
Nec1-555-5	11.3
Nec1-631-10	15.0
Nec1-730-4	9.2
Nec1-738-2	21.2
Nec1-749-1	16.5
Nec1-755-5	12.7
Nec1-758-8	6.3
Nec1-765-1	7.6
Nec1-803-2	13.3
Nec1-818-4	5.3

name	growth inhibition mean(%) (vs OV-90)
Nec1-834-1	14.5
Nec1-843-1	9.5
Nec1-845-2	12.3
Nec1-878-1	17.7
Nec1-888-11	8.3
Nec1-903-1	16.9
Nec1-908-2	14.7
Nec1-909-1	16.9
Nec1-918-2	15.0
Nec1-938-2	9.4
Nec1-1085-1	6.5
Nec1-111-3	11.2
Nec1-1150-2	13.0
Nec1-1163-2	5.7
Nec1-1204-4	11.6
Nec1-1209-8	13.2
Nec1-1214-5	7.3
Nec1-1314-3	12.8
Nec2-1625-4	7.2
Nec5-323-2	10.2
Nec6-505-2	6.6
Nec8-3704-7	16.9
Nec8-3941-4	10.5
Nec8-4024-5	13.4
Nec8-4116-8	14.1

160.

TABLE 7

name	Antibody conc. (μg/ml)	growth inhibition (%)
Nec1-244-3	100ug/mL	9.2
	30ug/ml	7.0
	10ug/mL	6.9
	3ug/ml	7.0
	1ug/mL	4.9
	0.3ug/ml	2.0
	0.03ug/ml	-1.3
Nec1-303-2	100ug/mL	6.2
	30ug/ml	6.9
	10ug/mL	5.5
	3ug/ml	3.0
	1ug/mL	5.1
	0.3ug/ml	-2.9
	0.03ug/ml	-7.4
Nec1-520-1	100ug/mL	8.5
	30ug/ml	11.3
	10ug/mL	13.7
	3ug/ml	9.3
	1ug/mL	7.0
	0.3ug/ml	1.2
	0.03ug/ml	2.0
Nec1-530-1	100ug/mL	13.7
	30ug/ml	9.6
	10ug/mL	8.2
	3ug/ml	10.3
	1ug/mL	8.2
	0.3ug/ml	0.5
	0.03ug/ml	-4.6

name	Antibody conc. (μg/ml)	growth inhibition (%)
Nec1-803-2	100ug/mL	17.4
	30ug/ml	14.3
	10ug/mL	16.8
	3ug/ml	13.5
	1ug/mL	15.5
	0.3ug/ml	15.1
	0.03ug/ml	3.8
Nec1-834-1	100ug/mL	11.8
	30ug/ml	12.9
	10ug/mL	8.3
	3ug/ml	9.6
	1ug/mL	12.8
	0.3ug/ml	0.8
	0.03ug/ml	2.9
Nec1-845-1	100ug/mL	15.7
	30ug/ml	8.3
	10ug/mL	10.3
	3ug/ml	5.8
	1ug/mL	11.8
	0.3ug/ml	4.6
	0.03ug/ml	-3.2
Nec1-903-1	100ug/mL	5.8
	30ug/ml	7.3
	10ug/mL	2.8
	3ug/ml	3.9
	1ug/mL	4.5
	0.3ug/ml	-1.3
	0.03ug/ml	-6.3

EXAMPLE 7

ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

In the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1, Nec1-803-2, Nec8-4116-8, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-845-2, Nec8-3941-4, Nec1-834-1, Nec1-244-3, Nec1-918-2, Nec8-3806-1, Nec1-303-2 and Nec1-903-1 were applied to an ADCC measurement. The human ovarian cancer cell line OV-90 was used as target cells and commercially available frozen human peripheral blood mononuclear cells (Asahi Techno Glass Corp.) which had been cultured overnight in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10 nM recombinant human IL-2 (DIACLONE Research Inc.), 55 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen) and 10% FBS (JRH) were used as effector cells, respectively.

The OV-90 cell line in the logarithmic growth phase was recovered by the procedure described in EXAMPLE 6. The one million cells were labeled with ^{51}Cr by adding 250 μCi of $Na_2{}^{51}CrO_4$ (Amersham Biosciences, which name was changed to GE Healthcare Bio-sciences), followed by incubation at 37°C for an hour. These cells were washed 4 times with 0.4% BSA (Invitrogen)-containing RPMI 1640

medium (hereinafter referred to as 0.4% BSA/RPMI medium) and then resuspended at 1 x 10^5 cells/mL in 0.4% BSA/RPMI medium. Then, 100 μL (1 x 10^4 cells) of this target cell suspension and 50 μL solution in which the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies described above were diluted in 0.4% BSA/RPMI medium in final concentrations of 0.015 μg/mL, 0.15 μg/mL and 1.5 μg/mL were added to each well of a 96-well RMC plate (BIOBIK). The same volume of non-immune human IgG (final concentration of 1.5 μg/mL) or D-PBS (Invitrogen) was added as a negative control. After incubating these plates on ice for an hour, 5 x 10^5 cells each/well of the effector cell suspension described above was added (effector cells : target cells = 50 : 1), which was reacted at 37°C for 4 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. The cell suspension in each well was transferred to a 96-well multiscreen 45 μm (Millipore) and centrifuged to recover the culture supernatants. The radioactivity (sample release) leaked out of the cells in these culture supernatants was measured using γ counter (AccuFLEX γ7000; Aloka Co.). The maximum cytotoxic activity (maximum release) of ADCC was defined as the radioactivity detected in the culture supernatant when Triton-X 100 (Sigma) was added to be a final concentration of 1%, whereas the spontaneous release activity (spontaneous release) was defined as the radioactivity detected in the culture supernatant when 10% FBS-supplemented RPMI 1640 medium was added in place of the effector cells, respectively. The specific lysis (%) as an indicator of the ADCC intensity was calculated by ([sample release]-[spontaneous release])/([maximum release]-[spontaneous release]) x 100 (TABLE 8). ADCC (specific lysis (%)) was both 17% when non-immune human IgG (final concentration of 1.5 μg/mL) or D-PBS was added, whereas ADCC of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies Nec1-803-2, Nec8-4116-8, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-845-2, Nec8-3941-4, Nec1-834-1 and Nec1-903-1, which belong to the subclass IgG_1, showed percentages as significantly high as 35%, 34%, 30%, 27%, 30%, 34%, 31% and 32%, respectively, at 1.5 μg/mL. In particular, the antibody Nec8-4116-8 demonstrated more potent ADCC than the other anti-nectin-2 human monoclonal antibodies, represented by the specific lysis of 33% even at the final antibody concentration of 0.015 μg/mL.

TABLE 8

Antibody	Antibody conc. (μg/ml)	Specific lysis (%)
non-immune IgG	1.5	17
No Ab	-	17
Nec1-803-2	0.015	23
	0.15	31
	1.5	35
Nec8-4116-8	0.015	33
	0.15	33
	1.5	34
Nec1-520-1	0.015	21
	0.15	27
	1.5	30
Nec1-530-1	0.015	19
	0.15	25
	1.5	27
Nec1-845-2	0.015	22
	0.15	28
	1.5	30
Nec8-3941-4	0.015	23
	0.15	32
	1.5	34
Nec1-834-1	0.015	19
	0.15	26
	1.5	31
Nec1-244-3	0.015	16
	0.15	22
	1.5	24
Nec1-918-2	0.015	21
	0.15	22
	1.5	25
Nec8-3806-1	0.015	16
	0.15	20
	1.5	22
Nec1-303-2	0.015	21
	0.15	26
	1.5	24
Nec1-903-1	0.015	24
	0.15	33
	1.5	32
Spontaneous release	–	0
Maximum release	–	100

EXAMPLE 8

Additional preparation of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

In addition to the antibodies prepared in EXAMPLE 1, KM mice were immunized by the following procedure to prepare anti-nectin-2 human monoclonal antibodies additionally. In other words, an emulsion prepared by mixing the nectin-2ED-Fc protein (1.6 mg/mL PBS solution) prepared in REFERENCE EXAMPLE 16 with an equivalent volume of Freund's complete adjuvant (Difco) was administered subcutaneously and intracutaneously to five KM mice (10 weeks old,

12 weeks old, male; Kirin Brewery Co., Ltd.) at a dose of 50 μg/mouse. Two weeks after, the protein emulsion prepared using Freund's incomplete adjuvant (Difco) was administered subcutaneously and intracutaneously to the mice at a dose of 25 μg/mouse, followed by further immunization of the same protein emultion at a dose of 10 μg/mouse after interval of two weeks.

Prior to the first immunization and one week after the third immunization, blood was collected from the ocular fundus of all the mice under ethereal anesthesia to prepare antisera, and the antibody titer in the sera was determined in a manner similar to the procedure described in EXAMPLE 1. Nectin-2ED-Fc was administered in a dose of 10 μg each/mouse by tail vein injection to the KM mice of which a sufficient increase in the serum antibody titer was confirmed, as a final booster. Anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridomas were additionally obtained from the mice, and the antibody was prepared from the culture supernatant thereof by the same procedure as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 9

Cross-reactivity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies to the nectin-1, nectin-3, nectin-4 and Necl-5 proteins

In order to confirm the specificity of the anti-nectin-2 human monoclonal antibody prepared in EXAMPLE 1 to human nectin-2, the cross-reactivity to the human nectin family proteins (Nectin-1, Nectin-3 and Nectin-4) and human Necl-5 was examined by flow cystometry (hereinafter referred to as FCM) using cells transiently expressing these proteins. Specifically, CHO-K1 cell line was incubated in a T75 flask charged with a medium mixture of DMEM and F-12 in equivalent volumes (Invitrogen) supplmented with 10% FBS (JRH) at 37°C for 1 to 2 days in a 5% carbon dioxide gas flow. When the cells became about 90% confluent, pEE12.4-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 18, pCMV-Tag4-Nectin-1, pCMV-Tag4-Nectin-3, pCMV-Tag4-Nectin-4 and pCMV-Tag4-Necl-5 prepared in REFERENCE EXAMPLE 29 and pcDNA3.1(+) (Invitrogen) as a negative control plasmid were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the protocol attached. Four hours after the transfection, the medium for the CHO-K1 cells was exchanged with a fresh aliquot of the medium described above, followed by incubation for further 2 days. These cells were washed twice with D-PBS, detached by Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS-based (Invitrogen) and resuspended in D-PBS (-) containing

1%FBS and 0.1% sodium azide (hereinafter referred to as FCM buffer) at a density of 5 x 10^6 cells/mL. These cell suspensions were added to a 96-well V-bottom plate by 30 μL each, and 20 μL each of anti-human nectin-2 human monoclonal antibody (Nec1-803-2, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-834-1, Nec1-244-3, Nec1-303-2, Nec1-903-1 or Nec8-4116-8) and positive control antibodies [anti-human nectin-1 mouse monoclonal antibody (ZYMED), anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody N2-No. 2 prepared in REFERENCE EXAMPLE 14, anti-human nectin-3 rabbit polyclonal antibody prepared in REFERENCE EXAMPLE 27, anti-human nectin-4 goat polyclonal antibody (R & D) or anti-human Necl-5 mouse monoclonal antibody (LAB VISION)] diluted in FCM buffer to 15 μg/mL (final concentration: 6 μg/mL) were added thereto, followed by reacting them on ice for an hour. After 200 μL of FCM buffer was added to each well and washed once by centrifugal operation, 50 μL/well of Alexa488-labeled secondary antibody diluted in FCM buffer to 10 μg/mL was added for suspension, which was then reacted on ice for an hour. The secondary antibody used was Alexa Fluor488 goat anti-human IgG (H+L) when human antibody was used as the primary antibody, Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (H+L) when mouse antibody was used as the primary antibody, Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG (H+L) when rabbit antibody was used as the primary antibody, and Alexa Fluor488 donkey anti-goat IgG (H+L) (Invitrogen) when goat antibody was used as the primary antibody, respectively. After these cells were further washed twice with FCM buffer and then resuspended in 250 μL of FCM buffer, fluorescence intensity of the stained cells was measured by the flow cytometer MPL500 (BECKMAN COULTER). A ratio of the median value of fluorescence intensities of negative control plasmid pcDNA3.1(+)-transfected CHO-K1 cells to the median value of fluorescence intensities of each gene-transfected CHO-K1 cells was calculated for each antibody. The results are shown in TABLE 9. When this ratio is 1, it is meant that the antibody does not bind at all to the protein, whereas the larger the ratio, the stronger the antibody binds to the protein. These results reveal that the eight anti-human nectin-2 human monoclonal antibodies provided for this experiment are human nectin-2 specific antibodies which don't cross-react to the other human nectin family proteins (nectin-1, nectin-3 and nectin-4) or human Necl-5.

TABLE 9

	Nectin-1	Nectin-2	Nectin-3	Nectin-4	Necl-5
Positive control antibody	79.9	151.6	10.7	3.7	496.8
Nec1-803-2	1.2	75.0	1.2	1.1	1.1
Nec1-520-1	1.1	62.6	1.1	1.2	1.0
Nec1-530-1	1.0	66.7	1.2	1.1	1.0
Nec1-834-1	1.2	63.1	1.2	1.1	1.0
Nec1-244-3	1.2	57.5	1.2	1.2	1.1
Nec1-303-2	1.0	11.1	1.0	0.9	0.9
Nec1-903-1	1.2	71.9	1.2	1.1	1.2
Nec8-4116-8	1.3	71.7	1.1	1.1	1.0

EXAMPLE 10

Nectin-2-nectin-2 trans-binding inhibitory activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

The nectin-2-nectin-2 trans-binding inhibitory activities of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLES 1 and 8 were quantitatively assessed by the following method utilizing time-resolved fluorescence spectroscopy. First, 1 mg of the nectin-2ED-Fc protein prepared in REFERENCE EXAMPLE 16 was concentrated and replaced with 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6) by means of ultrafiltration to prepare 4 mg/mL of the solution. After adding Eu-labeling Reagent attached to DELFIA Eu-Labeling Kit (Perkin Elmer) to this nectin-2ED-Fc solution, the mixture was reacted at 4°C overnight. The unreacted Eu^{3+} was removed from the reaction mixture by the aforesaid ultrafiltration and at the same time, the buffer was replaced with PBS to prepare Eu-labeled nectin-2ED-Fc. The number of Eu^{3+} introduced in this case was 5.23 molecules per molecule of nectin-2-ED-Fc. Next, nectin-2-ED-Fc was diluted in 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6) to a concentration of 5 μg/mL, and the dilution was added to a Wallac Delfia plate (Perkin Elmer) by 100 μL each/well, which was then reacted at room temperature for 5 hours. Thereafter, 200 μL each of PBS containing 2% BSA was added to each well for blocking overnight at 4°C. After washing the plate twice with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), anti-nectin-2 human monoclonal

antibody or Control hIgG (Human IgG Whole molecule Chrom Pure; Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted in PBS containing 0.2% BSA to 600 μg/mL was mixed with an equivalent volume of Eu-labeled nectin-2ED-Fc diluted in PBS containing 0.2% BSA to 6.4 μg/mL, which was added by 100 μL each/well, followed by reacting at room temperature for 1.5 hours. After this plate was washed 6 times with PBS-T, 200 μL each/well of Enhancement Solution (Perkin Elmer) was added, followed by stirring at room temperature for a minute with a plate mixer. The fluorescence of each well thus reacted was measured at 615 nm (excitation light: 340 nm, delayed time: 400 μsecs.) using ARVO 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer), and the nectin-2-nectin-2 trans-binding inhibition rate was calculated by the following formula.

Nectin-2-nectin-2 trans-binding inhibition rate (%) = (A - B) x 100/A

A: Count when control hIgG is used

B: Count when anti-nectin-2 human monoclonal antibody is used

The nectin-2-nectin-2 trans-binding inhibitory activities of the respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies are collectively shown in TABLE 10.

TABLE 10

Name	Nectin-2-Nectin-2 trans-binding inhibition (%)
Nec1-244-3	28
Nec1-259-1	24
Nec1-303-2	19
Nec1-316-1	30
Nec1-631-10	78
Nec1-738-3	38
Nec1-740-1	71
Nec1-834-1	40
Nec1-878-1	69
Nec1-918-2	34
Nec1-1115-2	7

L67

Nec1-1150-2	48
Nec1-1209-8	28
Nec8-3717-4	70
Nec8-3823-4	79
Nec8-4024-5	30
Nec8-4111-2	76
Control hIgG	0

EXAMPLE 11

ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

In the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1, Nec1-964-1 of Group I, Nec1-303-1, Nec1-554-1 and Nec1-1302-2 of Group IV, Nec1-769-2 and Nec1-1305-1 of Group V, Nec1-141-3, Nec1-209-2, Nec1-909-1, Nec1-847-2 and Nec1-803-2 of Group VI, Nec8-4116-8 of Group VII were applied to an ADCC measurement. The human ovarian cancer cell line OV-90 was used as target cells and commercially available frozen human peripheral blood mononuclear cells (Asahi Techno Glass Corp.) which had been cultured overnight in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 0.1 nM recombinant human IL-2 (DIACLONE Research Inc.), 55 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen) and 10% FBS (JRH) was used as effector cells, respectively.

The OV-90 cell line in the logarithmic growth phase was recovered by the procedure described in EXAMPLE 6. The one million cells were labeled with ^{51}Cr by adding 250 μCi of $Na_2{}^{51}CrO_4$ (GE Healthcare Bio-sciences), followed by incubation at 37°C for an hour. These cells were washed 4 times with 0.4% BSA (Invitrogen)-containing RPMI 1640 medium (hereinafter referred to as 0.4% BSA/RPMI medium) and resuspended at 1×10^5 cells/mL in 0.4% BSA/RPMI medium. Then, 100 μL (1×10^4 cells) of this target cell suspension and 50 μL solution in which the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies described above were diluted in 0.4% BSA/RPMI medium in final concentrations of 0.0015 μg/mL, 0.015 μg/mL, 0.15 μg/mL and 1.5 μg/mL were added to each well of a 96-well RMC plate (BIOBIK). The same volume of non-immune human IgG (final concentration of 1.5 μg/mL) or D-PBS (Invitrogen) was added as a negative control. After incubating these plates on ice for an hour, 5×10^5 cells each/well of the effector cell suspension described above was added (effector cells : target cells = 50 : 1), which

was reacted at 37°C for 4 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. The cell suspension in each well was transferred to a 96-well multiscreen 45 μm (Millipore) and centrifuged to recover the culture supernatants. The radioactivity (sample release) leaked out of the cells in these culture supernatants was measured using γ counter (AccuFLEX γ7000; Aloka Co.). The maximum cytotoxic activity (maximum release) of ADCC was defined as the radioactivity detected in the culture supernatant when Triton-X 100 (Sigma) was added to be a final concentration of 1%, whereas the spontaneous release activity (spontaneous release) was defined as the radioactivity detected in the culture supernatant when 10% FBS-supplemented RPMI 1640 medium was added in place of the effector cells, respectively. The specific lysis (%) as an indicator of the ADCC intensity was calculated by ([Sample release]-[Spontaneous release])/([Maximum release]-[Spontaneous release]) x 100 (TABLES 11 and 12).

ADCC (specific lysis (%)) was 4% or 3%, respectively, when non-immune human IgG (final concentration of 1.5 μg/mL) or D-PBS was added, whereas ADCC of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies: Nec1-964-1 of Group I, Nec1-554-1, Nec1-1302-2 and Nec1-769-2 of Group IV, Nec1-803-2 of Group VI, and Nec8-4116-8 of Group VII, showed the rates as significantly high as 12%, 19%, 15%, 12%, 15% and 17%, respectively, at 1.5 μg/mL. In particular, the antibody Nec1-554-1 of Group IV and Nec8-4116-8 of Group VII exhibited more potent ADCC than the other anti-nectin-2 human monoclonal antibodies, represented by the specific lysis was 15% and 12%, respectively, at the final antibody concentration of 0.15 μg/mL..

TABLE 11

Antibody	Antibody (μg/ml)	Specific lysis (%)
Non-immune IgG	1.5	4
D-PBS	-	3
Nec1-964-1	0.0015	-3
	0.015	2
	0.15	8
	1.5	12

Nec1-303-1	0.0015	-1
	0.015	1
	0.15	0
	1.5	3
Nec1-554-1	0.0015	0
	0.015	7
	0.15	15
	1.5	19
Nec1-1302-2	0.0015	3
	0.015	3
	0.15	7
	1.5	15
Nec1-769-2	0.0015	4
	0.015	5
	0.15	10
	1.5	12
Nec1-1305-1	0.0015	3
	0.015	4
	0.15	4

TABLE 12

Antibody	Antibody (μg/ml)	Specific lysis (%)
Nec1-1305-1	1.5	5
Nec1-141-3	0.0015	-3
	0.015	-2
	0.15	-3
	1.5	-2
Nec1-209-2	0.0015	-3
	0.015	-1
	0.15	2
	1.5	4
Nec1-909-1	0.0015	-1
	0.015	-1

	0.15	0
	1.5	3
Nec1-847-2	0.0015	1
	0.015	1
	0.15	8
	1.5	11
Nec1-803-2	0.0015	0
	0.015	3
	0.15	8
	1.5	15
Nec8-4116-8	0.0015	2
	0.015	1
	0.15	12
	1.5	17

EXAMPLE 12

In vivo anti-tumor activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

In the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in EXAMPLE 1, the anti-tumor activities of Nec1-803-2, Nec1-964-1, Nec1-303-2, Nec1-554-1SP3, Nec1-1302-2, Nec1-769-2, Nec1-1305-1, Nec1-141-3, Nec1-209-2, Nec1-909-1 and Nec1-847-2 were evaluated in nude mice models subcutaneously-transplanted with the OV-90 human ovarian cancer cell line. The anti-nectin-2 human monoclonal antibody samples used were those prepared by the procedure described in REFERENCE EXAMPLE 28. The OV-90 cell line was seeded on a 150 cm^2 tissue culture flask (Corning) using an equivolume medium mixture of MCDB105 (Sigma) and Medium 199 (Sigma), supplemented with 15% FBS (JRH), and incubated at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. The OV-90 cell line suspension harvested at the logarithmic growth phase by detachment treatment with trypsin-EDTA, was washed 3 times with Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen) using centrifugal operation (1,000 rpm, 3 minutes). The cells thus obtained were resuspended in HBSS at a density of 8×10^7 cells/mL.

After nude mice (BALB/cAJcl-nu/nu) (5 weeks old, female), purchased from Nippon Crea, were tamed for a week, the OV-90 cell suspension described above was inoculated subcutaneously into the ventral area at a dose of 100 μL each/animal. Ten days after the cell inoculation, the long diameter and short

diameter of the OV-90 tumor mass were measured with calipers and the tumor volume was calculated according to the formula described below.

Tumor volume (mm^3) = long diameter x (short diameter)^2/2

From the nude mice transplanted with the OV-90 cell line, the mice in which engrafted tumor mass was observed were selected, and the weight of each animal was measured. The mice were grouped such that a mean tumor mass volume of each group was equivalent (about 50 mm^3). On Days 10, 13, 17, 20, 24, 27 and 31 after the cell inoculation, the anti-nectin-2 human monoclonal antibody solution diluted in PBS to 0.15 mg/mL or PBS was intravenously administered at 10 mL each/kg through the tail vein and at the same time, the tumor volume was measured by the procedure described above. The growth inhibitory activity of the anti-nectin-2 human monoclonal antibody was assessed by calculating T/C (Treatment/Control) value based on the tumor volume 4 weeks after commencement of drug administration, according to the formula below. For the significance test between the administration groups, the parametric Dunnett multiple comparison test (SAS preclinical package Version 5.0) was used.

T/C (%) = [(Increased tumor volume in the antibody group from commencement of drug administration)/(Increased tumor volume in the PBS group from commencement of drug administration)] x 100

In the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies described above, some antibodies strongly suppressed the growth of OV-90 cell line tumor mass and some antibodies weakly suppressed the growth. The T/C of the respective anti-nectin-2 human monoclonal antibodies and the significance test values (*P* values) against the PBS group are collectively shown in TABLE 13.

TABLE 13

	T/C (%)	*P* value
Nec1-803-2	47	0.0113
Nec1-964-1	62	
Nec1-303-2	102	

Nec1-554-1SP3	34	0.0028
Nec1-1302-2	63	
Nec1-769-2	83	
Nec1-1305-1	104	
Nec1-141-3	72	
Nec1-209-2	94	
Nec1-909-1	74	
Nec1-847-2	81	

EXAMPLE 13

Analysis of binding domains of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

As one of epitope search methods for the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies, the reactivities with the Ig1 domain (47th-142nd of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3)-deficient protein and of Ig2 domain (175th-240th of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3)-deficient protein of nectin-2 were examined by FCM using the CHO-K1 cells wherein these proteins were transiently expressed. Specifically, suspensions of CHO-K1 cells, in which pEE12.4-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 18 and pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg1 and pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg2 prepared in REFERENCE EXAMPLE 30, or pcDNA3.1(+) as a negative control were transiently expressed, were prepared by the same procedure as in EXAMPLE 9. These cell suspensions were added to each well of a 96-well V-bottom plate by 30 μL each, and several anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 or the anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody N2-No. 2 prepared in REFERENCE EXAMPLE 14, which was diluted in FCM buffer to 15 μg/mL, was added thereto by 20 μL (final concentration: 6 μg/mL) each, followed by reaction on ice for an hour. After 200 μL of FCM buffer was added to each well and washed once by centrifugal operation, 50 μL each of Alexa488-labeled secondary antibody diluted in FCM buffer to 10 μg/mL was added to and mixed therewith, and the mixture was then reacted on ice for an hour. The Alexa488-labeled secondary antibody used was Alexa Fluor488 goat anti-human IgG (H+L) for the human antibodies and Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) for the rabbit antibody. The cells in each well were washed twice with FCM buffer and then resuspended in 250 μL of FCM buffer. Using the flow

cytometer MPL500 (BECKMAN COULTER), the fluorescence intensity of stained cells was measured to determine the ratio of the median value of fluorescence intensities of the respective antibodies in the primary antibody group to the median value of fluorescence intensities in the negative control group. The ratio was expressed in terms of the reactivity with each of the gene-transfected CHO-K1 cells and shown in TABLES 14 and 15. In the tables, the reactivities with the pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg1-transfected cells and pcDNA3.1(+)-Nectin-2ΔIg2-transfected cells are expressed as delta-Ig1 and delta-Ig2, respectively. When the ratio to the negative control is 2 or more, it is defined that there is a reactivity, whereas when the ratio to delta-Ig1 was 2 or more and the ratio to delta-Ig2 is 2 or less, the antibody was judged to recognize the Ig2 domain of nectin-2; and when the ratio to delta-Ig1 was 2 or less and the ratio to delta-Ig2 is 2 or more, the antibody was judged to recognize the Ig1 domain of nectin-2. The binding domain (epitope domain) of an antibody showing 2 or less in the two ratios described above was listed as "unknown."

The results suggested that the antibodies belonging to epitope groups IV would recognize the Ig2 domain of nectin-2. The results also suggested that the antibodies belonging to epitope groups V and VI would recognize the Ig1 domain of nectin-2.

TABLE 14

Name	delta-Ig1	delta-Ig2	Epitope domain
None	1.0	1.1	
Polyclonal Ab	4.5	8.9	
Nec1-102-1	1.0	4.6	Ig1
Nec1-141-3	1.0	2.6	Ig1
Nec1-202-1	1.0	1.4	unknown
Nec1-244-3	1.0	2.9	Ig1
Nec1-308-2	1.1	1.1	unknown
Nec1-313-1	1.0	1.0	unknown
Nec1-333-1	4.2	1.1	Ig1
Nec1-410-3	2.9	1.3	Ig2
Nec1-460-1	0.8	2.8	Ig1
Nec1-464-1	1.0	3.5	Ig1

Nec1-503-3	1.0	1.0	unknown
Nec1-738-2	1.0	5.1	Ig1
Nec1-755-5	1.0	4.8	Ig1
Nec1-803-2	1.0	5.3	Ig1
Nec1-888-11	1.0	1.0	unknown
Nec1-909-1	1.0	3.5	Ig1
Nec1-919-1	1.0	6.9	Ig1
Nec1-930-1	1.0	1.1	unknown
Nec1-964-1	1.1	1.1	unknown
Nec1-1044-4	2.2	0.8	Ig2
Nec1-1302-2	4.1	1.1	Ig2
Nec6-151-4	1.0	1.0	unknown
Nec8-3410-1	1.0	1.3	unknown
Nec8-3823-5	0.9	3.0	Ig1
Nec8-4116-8	1.0	1.0	unknown

TABLE 15

Name	delta-Ig1	delta-Ig2	Epitope domain
Polyclonal Ab	7.8	10.6	
None	1.0	1.0	
Nec1-554-1 SP3	4.3	1.0	Ig2
Nec1-1236-1 SP3	4.5	1.1	Ig2
Nec1-215-8 SP3	4.4	1.1	Ig2
Nec1-333-3 SP3	4.2	1.1	Ig2
Nec1-1044-4	2.9	1.1	Ig2
Nec1-554-1	3.6	1.0	Ig2
Nec1-215-8	4.3	1.1	Ig2
Nec1-1236-1	4.4	1.2	Ig2
Nec1-1613-3	5.1	1.1	Ig2
Nec1-333-3	3.6	1.1	Ig2
Nec1-326-7	1.1	1.3	Unknown
Nec1-1138-1	4.0	1.0	Ig2
Nec1-1218-7	2.5	1.1	Ig2

Nec1-803-2	0.9	6.2	Ig1
Nec1-244-3	1.0	4.8	Ig1
Nec8-4116-8	0.9	1.0	Unknown
Nec1-103-1	1.0	1.3	Unknown
Nec1-1302-2	3.5	1.2	Ig2
Nec1-1005-2	2.0	0.8	Ig2

EXAMPLE 14

Cross-reactivity of anti-nectin-2 monoclonal antibodies with cynomolgus monkey nectin-2

Cross-reactivities of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 with the cynomolgus monkey nectin-2 were examined by FCM using the CHO-K1 cells wherein the cynomolgus monkey nectin-2 was transiently expressed. By the same procedure as in EXAMPLE 9, the suspensions of CHO-K1 cells, in which pEE12.4-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 18 and pcDNA3.1(+)-maNectin-2 prepared in REFERENCE EXAMPLE 32, or pcDNA3.1(+) as a negative control were transiently expressed, were prepared. These cell suspensions were added to each well of a 96-well V-bottom plate by 30 μL each, and several anti-human nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 or the anti-nectin-2 rabbit polyclonal antibody N2-No. 2 prepared in REFERENCE EXAMPLE 14 as a positive control antibody , diluted in FCM buffer to 15 μg/mL was added by 20 μL each (final concentration: 6 μg/mL), followed by reaction on ice for an hour. Then, after 200 μL of FCM buffer was added to each well and washed once by centrifugal operation, 50 μL each of Alexa488-labeled secondary antibody diluted in FCM buffer to 10 μg/mL was added thereto for suspension, and the mixture was then reacted on ice for an hour. As secondary antibodies, Alexa Fluor488 goat anti-human IgG (H+L) was used for the human antibodies and Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) was used for the rabbit antibody, respectively. Next, the cells were washed twice with FCM buffer and then resuspended in 250 μL of FCM buffer. Using the flow cytometer MPL500 (BECKMAN COULTER), the fluorescence intensity of stained cells was measured to confirm the binding reactivities of respective antibodies. For the respective antibodies, the ratio of the median value of fluorescence intensities in the primary antibody group to the median value of fluorescence intensities in the negative control group is shown in TABLE 16. The results revealed that in the

anti-human nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 there were the antibodies which were cross-reactive to and not to cynomolgus monkey nectin-2. Nec1-554-1 belonging to Epitope Group IVb, Nec1-319-2 and Nec1-843-1 belonging to Epitope Group VI and Nec8-4116-8 belonging to Epitope Group VII showed the cross-reactivity to the cynomolgus monkey nectin-2. To the contrary, Nec1-111-3, Nec1-144-1, Nec1-209-2, Nec1-244-3, Nec1-316-1, Nec1-332-1, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-704-1, Nec1-730-4, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-843-1, Nec1-845-2, Nec1-903-1, Nec1-909-1, Nec1-918-2, Nec1-1214-5 and Nec8-4024-5 belonging to Epitope Group VI showed no cross-reactivity to the cynomolgus monkey nectin-2.

TABLE 16

	Human Nectin-2	Cynomolgus monkey Nectin-2
No primary antibody	0.8	0.9
Positive control antibody	18.7	15.8
Nec1-111-3	29.9	1.3
Nec1-144-1	37.9	1.2
Nec1-209-2	45.8	1.6
Nec1-244-3	24.6	1.1
Nec1-316-1	38.4	1.1
Nec1-319-2	47.8	4.2
Nec1-332-1	51.7	1.3
Nec1-520-1	25.4	1.0
Nec1-530-1	40.5	1.0
Nec1-554-1	43.0	14.8
Nec1-704-1	22.2	1.3
Nec1-730-4	36.3	1.4
Nec1-803-2	48.6	1.1
Nec1-834-1	49.5	1.1
Nec1-843-1	47.6	3.1
Nec1-845-2	42.9	1.7
Nec1-903-1	43.9	1.1
Nec1-909-1	43.7	1.7
Nec1-918-2	28.3	1.3

Nec1-1214-5	45.4	1.8
Nec8-4024-5	59.2	2.0
Nec8-4116-8	44.3	30.9

EXAMPLE 15

Cross-reactivity of anti-nectin-2 human monoclonal antibody to nectin-2 mutants introduced cynomolgus monkey-like mutation

Cross-reactivities of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 to human nectin-2 mutants introduced cynomolgus monkey-like mutation were examined by FCM using the CHO-K1 cells wherein the human nectin-2 mutants introduced cynomolgus monkey-like mutation were transiently expressed. By the same procedure as in EXAMPLE 9, the suspensions of CHO-K1 cells, in which pEE12.4-Nectin-2δ prepared in REFERENCE EXAMPLE 18 and the animal cell expression vector for human nectin-2 mutants introduced cynomolgus monkey-like mutation; pcDNA3.1(+)-Nectin-2 (AN77-78PD), pcDNA3.1(+)-Nectin-2 (G113R) or pcDNA3.1(+)-Nectin-2 (H128R) prepared in REFERENCE EXAMPLE 33, and pcDNA3.1(+) as a negative control were transiently expressed, were prepared. These cell suspensions were added to each well of a 96-well V-bottom plate by 30 μL each, and several anti-human nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 diluted in FCM buffer to 15 μg/mL was added by 20 μL each (final concentration: 6 μg/mL), followed by reaction on ice for an hour. Then, after 200 μL of FCM buffer was added to each well and washed once by centrifugal operation, 50 μL of Alexa Fluor488 goat anti-human IgG (H+L) diluted in FCM buffer to 10 μg/mL was added thereto for suspension, and the mixture was then reacted on ice for an hour. Next, the cells were washed twice with FCM buffer and resuspended in 250 μL of FCM buffer. Using flow cytometer MPL500 (BECKMAN COULTER), the fluorescence intensities of stained cells were measured, respectively. The ratio of the median value of fluorescence intensities in the primary antibody group to the median value of fluorescence intensities of the respective antibodies in the negative control group is shown in TABLE 17. The results revealed that Nec1-111-3, Nec1-209-2, Nec1-244-3, Nec1-316-1, Nec1-332-1, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-704-1, Nec1-730-4, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-843-1, Nec1-845-2, Nec1-903-1, Nec1-909-1, Nec1-918-2, Nec1-1214-5 and Nec8-4024-5 belonging to Group VI bound equally to G113R and H128R, but did not bind to AN77-78PD. The results

suggest the possibility that these human monoclonal antibodies would recognize the region containing Ala^{77} or Asn^{78} of nectin-2. On the other hand, Nec1-554-1 belonging to Group IVb, Nec1-144-1, Nec1-319-2 and Nec1-843-1 belonging to Group VI, and Nec8-4116-8 belonging to Group VII bound to AN77-78PD, G113R and H128R with equal affinity to nectin-2.

TABLE 17

	Nectin-2	AN77-78PD	G113R	H128R
No primary antibody	0.8	0.9	0.8	0.8
Positive control antibody	18.7	20.3	17.9	19.8
Nec1-111-3	29.9	1.4	28.5	38.6
Nec1-144-1	37.9	19.3	30.9	27.2
Nec1-209-2	45.8	1.9	41.9	56.8
Nec1-244-3	24.6	1.1	23.3	29.6
Nec1-316-1	38.4	1.2	37.8	50.0
Nec1-319-2	47.8	6.9	43.8	61.1
Nec1-332-1	51.7	1.6	43.7	60.6
Nec1-520-1	25.4	1.0	22.5	31.6
Nec1-530-1	40.5	0.9	36.7	51.5
Nec1-554-1	43.0	44.2	38.7	51.5
Nec1-704-1	22.2	1.4	19.3	25.3
Nec1-730-4	36.3	1.0	32.4	42.2
Nec1-803-2	48.6	1.1	41.9	54.9
Nec1-834-1	49.5	1.2	45.9	55.8
Nec1-843-1	47.6	4.1	43.1	52.4
Nec1-845-2	42.9	2.3	40.1	51.9
Nec1-903-1	43.9	0.9	38.9	55.8
Nec1-909-1	43.7	1.4	32.5	45.5
Nec1-918-2	28.3	1.4	26.0	34.3
Nec1-1214-5	45.4	1.7	42.4	53.7
Nec8-4024-5	59.2	2.2	50.7	71.1
Nec8-4116-8	44.3	40.9	37.5	50.5

EXAMPLE 16

Epitope analysis of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies belonging to Epitope Groups V and VI

In EXAMPLE 13, it was suggested that the antibodies belonging to Epitope Groups V and VI would recognize the Ig1 domain of nectin-2. In order to identify the epitopes of these anti-nectin-2 human monoclonal antibodies in more detail, recombinant proteins were prepared by a single amino acid substitution in the Ig1 domain of Nectin-2ED-Fc, and the binding activities of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies against these mutants were examined. The pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc prepared in REFERENCE EXAMPLE 15 and the animal cell expression vectors for single amino acid substituted mutants of Nectin-2ED-Fc which were prepared in REFERENCE EXAMPLE 34: pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q37A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (P40G), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q45A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (H55A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (V60A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Y64A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q71A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (A75G), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (P76G), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (A77G), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (N78A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (H79A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q80A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (N81A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K88A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (S95A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K109A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (E117A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (D122A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (H128A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (N137A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (F145A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K147A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (V150A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (M153A) or pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (T154A), were transfected to the 293F cell line by using 293 Fectin (Invitrogen). These cells were rotation cultured at 37°C for 3 days in an 8% carbon dioxide gas flow to secret the Nectin-2ED-Fc protein encoded by the plasmid described above, and its single amino acid mutant proteins [Q37A, P40G, Q45A, H55A, V60A, Y64A, Q71A, A75G, P76G, A77G, N78A, H79A, Q80A, N81A, K88A, S95A, K109A, E117A, D122A, H128A, N137A, F145A, K147A, V150A, M153A, T154A] into the culture supernatant. The culture supernatant was prepared from each cell suspension by centrifugal operation and filter filtration and provided for the subsequent ELISA.

The anti-nectin-2 human monoclonal antibody Nec8-4116-8 prepared in EXAMPLE 1 was diluted in 50 mM sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) to a concentration of 5 μg/mL. The dilution was added to a 96-well half

well immunoplate (Costar) by 50 μL each/well, followed by reacting at room temperature for 5 hours. After the reaction solution was removed from each well, 100 μL each /well of PBS containing 2% BSA was added for blocking at 4°C overnight. The plate for ELISA thus prepared was washed twice with PBS containing 0.05% Tween 20, a 5-fold dilution in PBS containing 0.2 % BSA of the culture supernatant of 293F cell line, in which the Nectin-2ED-Fc protein (wild type) and the single amino acid substitution protein of Nectin-2ED-Fc were transiently expressed, was added by 50 μL each/well, followed by reaction at room temperature for 2 hours. Also, the medium for 293F cell line was added to the same plate as a negative control. After washing this plate 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20, the biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibody prepared in EXAMPLE 4 diluted in PBS containing 0.2% BSA to concentrations of 5 ng/mL to 20 ng/mL and the resulting dilution was added by 50 μL each/well, followed by reaction at room temperature for 2 hours. After washing this plate 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20, avidin-HRP (Vector) diluted in PBS containing 0.2% BSA to 3,000-fold was added by 50 μL each/well, followed by reaction at room temperature for 2 hours. After washing this plate 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20, TMB solution (SureBlue Microwell TMB peroxidase substrate) was added by 50 μL each/well, which was maintained at room temperature for 1 minute for color formation. Then, 2N sulfuric acid (Wako Pure Chemical) was added by 50 μL each/well to terminate the enzyme reaction. Absorbance (450 nm) of each well was measured using a plate reader (Multiskan BICHROMATIC). The reactivity of each biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibody against the individual single amino acid substitution product of Nectin-2ED-Fc was calculated according to the following formula.

Reactivity (% wild type) = [absorbance (single amino acid substitution product) - absorbance (negative control)]/[absorbance (wild type) - absorbance (negative control)] x 100

In TABLE 18, the antibodies which are classified into Epitope Group VI in EXAMPLE 4 included those having decreased binding affinity to A75G, P76G and N78A and those having decreased binding affinity to A75G, P76G, N78A and N137A, suggesting that the former antibody group would recognize the epitopes containing Ala^{75}, Pro^{76} and Asn^{78} and the latter antibody group would recognize the epitopes

containing Ala^{75}, Pro^{76}, Asn^{78} and Asn^{137}. Also the antibodies classified into Epitope Group V in EXAMPLE 4 demonstrated reduction in reactivity with F145A, suggesting that these antibodies would recognize the epitopes containing Phe^{145}.

TABLE 18

(See attached papers)

EXAMPLE 17

Epitope analysis of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies belonging to Epitope Groups I and VII

In order to identify the epitopes for anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLE 1 in more detail, recombinant proteins were prepared by a single amino acid substitution in the Ig2 domain of Nectin-2ED-Fc, and the binding activities of these proteins were examined. The pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-hFc prepared in REFERENCE EXAMPLE 15 and the animal cell expression vectors for single amino acid substituted mutants of Nectin-2ED-Fc which were prepared in REFERENCE EXAMPLE 35: pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (Q165A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K170A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (F173A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (P177G), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (I184A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K186A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (L197A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (W202A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (E206A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (T212A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (T235A), pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (K239A) and pcDNA3.1(+)-Nectin-2ED-Fc (A249G), were transfected to the 293F cell line by using 293 Fectin (Invitrogen). These cells were rotation cultured at 37°C for 3 days in an 8% carbon dioxide gas flow to secret the Nectin-2ED-Fc protein encoded by the plasmid described above, and its single amino acid mutant proteins [Q165A, K170A, F173A, P177G, I184A, K186A, L197A, W202A, E206A, T212A, T235A, K239A, A249G] into the culture supernatant. The culture supernatant was prepared from each cell suspension by centrifugal operation and filter filtration and provided for the subsequent ELISA.

The anti-nectin-2 human monoclonal antibody Nec1-803-2 prepared in EXAMPLE 1 was diluted in 50 mM sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) to a concentration of 5 μg/mL. The dilution was added to a 96-well half well immunoplate (Costar) by 50 μL each/well, followed by reacting at room temperature for 5 hours. After the reaction solution was removed from each well, 100 μL each /well of PBS containing 2% BSA was added to for blocking at 4°C overnight. The plate for ELISA thus prepared was washed twice with PBS containing 0.05% Tween 20, a 25-fold or 125-fold dilution in PBS containing 0.2% BSA of the culture supernatant of 293F cell line, in which the Nectin-2ED-Fc protein (wild type) and the single amino acid substitution protein of Nectin-2ED-Fc were transiently expressed, was added by 50 μL each/well, followed by reaction at room

temperature for 2 hours. Also, the medium for 293F cell line was added to the same plate as a negative control. After washing this plate 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20, the biotinylated anti-nectin-2 antibody prepared in EXAMPLE 4 diluted in PBS containing 0.2% BSA to concentrations of 1 ng/mL to 20 ng/mL was added to the plate by 50 μL each/well, followed by reaction at room temperature for 2 hours. After washing this plate 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20, avidin-HRP (Vector) diluted in PBS containing 0.2% BSA to 3,000-fold was added to the plate by 50 μL each/well, followed by reaction at room temperature for 2 hours. After washing this plate 6 times with PBS containing 0.05% Tween 20, TMB solution (SureBlue Microwell TMB peroxidase substrate; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) was added by 50 μL each/well, which was maintained at room temperature for 1 minute for color formation. Then, 2N sulfuric acid (Wako Pure Chemical) was added by 50 μL each/well to terminate the enzyme reaction. Absorbance (450 nm) of each well was measured using a plate reader (SPECTRAmax 340PC; Molecular Devices, Inc.). The reactivity of each biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibody against the product by a single amino acid substitution of Nectin-2ED-Fc was calculated according to the formula below. The results are summarized in TABLE 19.

Reactivity (% wild type) = [absorbance (product by single amino acid substitution)-absorbance (negative control)]/[absorbance (wild type)- absorbance (negative control)] x 100

The binding activity of Nec1-964-1 belonging to Epitope Group I to the single amino acid substitution products of Nectin-2ED-hFc markedly decreased with I184A, K186A and T212A, suggesting that this antibody would recognize the epitopes containing Ile^{184}, Lys^{186} and Thr^{212}. On the other hand, the binding activity of Nec8-4116-8, Nec9-1004-1, Nec9-1236-1 and Nec9-1637-1 in the antibody group belonging to Epitope Group VII to the single amino acid substitution products of Nectin-2ED-hFc markedly decreased with F173A, suggesting that these antibodies would recognize the epitopes containing Phe^{173}.

TABLE 19

Name of clone	Nec1-964-1
Nectin 2-ED-Fc	100
Q165A	89
K170A	95
F173A	104
P177G	104
I184A	33
K186A	16
L197A	98
W202A	102
E206A	100
T212A	21
T235A	104
K239A	104

EXAMPLE 18

Subgrouping of epitope groups

The anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in EXAMPLES 1 and 8 were roughly classified into 7 epitope groups as shown in EXAMPLE 4. Subsequent studies revealed that these groups were further segmented. For example, when the results of competitive inhibition tests performed in EXAMPLE 4 were examined more closely, a group of antibodies belonging to Epitope Group IV were found to show the competitive inhibition with the antibodies of Epitope Group VII, too. These antibodies are considered to be somewhat different in epitope from the antibodies belonging to Epitope Group IV ,which showed no competitive inhibition with the antibodies of Epitope Group VII, which were subgrouped into Epitope Group IVb for convenience, and the antibody group belonging to Epitope Group IV but showing no competitive inhibition with Epitope Group VII were subgrouped into Epitope Group IVa (TABLE 20). In addition, a group of antibodies belonging to Epitope Group VI showed competitive inhibition with the antibodies belonging to Epitope Group I. These antibodies are considered to

recognize somewhat different epitopes from the antibodies of Epitope Group VI but showing no competitive inhibition with Epitope Group I, and for convenience, these antibodies were subgrouped into Epitope Group VIa. Furthermore, the antibody group belonging to Epitope Group VI but showing no competitive inhibition with Epitope Group I were divided into the antibody group which demonstrated decreased binding affinity to A75G, P76G and N78A and the antibody group which demostrated decreased binding affinity to A75G , P76G, N78A and N137A, from the results in EXAMPLE 16. Therefore, for convenience, the antibody group which demonstrated decreased binding affinity to A75G, P76G and N78A was subgrouped into Epitope Group VIb, and the antibody group which demonstrated decreased binding affinity to A75G , P76G, N78A and N137A was subgrouped into Epitope Group VIc (TABLE 20). In EXAMPLE 16, the antibody Nec1-141-3 belonging to Epitope Group VIa showed substantially the same binding affinity to any amino acid substitution mutants as to the wild type, suggesting that they are different in epitope from the antibodies of Epitope Group VIb or VIc. Further in EXAMPLE 17, the antibody group showing decreased binding affinity to F173A was found in the antibodies belonging to Epitope Group VII. Thus, for convenience, the antibody group belonging to Epitope Group VII which demonstrated decreased binding affinity to F173A was subgrouped into Epitope Group VIIa, and a group of the other antibodies belonging to Epitope Group VII were subgrouped into Epitope Group VIIb (TABLE 20).

TABLE 20

Name	Epitope group	Name	Epitope group
Nec1-102-1	VIa	Nec1-903-1	VIb
Nec1-105-1	VIa	Nec1-948-3	VIa
Nec1-111-3	IVa	Nec1-1005-2	IVa
Nec1-141-3	VIa	Nec1-1008-1	IVa
Nec1-209-3	VIc	Nec1-1044-4	IVb
Nec1-215-3	IVb	Nec1-1138-1	IVb
Nec1-231-1	IVa	Nec1-1142-1	IVa
Nec1-244-3	VIc	Nec1-1163-2	VIa

Nec1-303-2	IVa	Nec1-1218-7	IVb
Nec1-313-1	VIa	Nec1-1236-1	IVb
Nec1-326-7	IVb	Nec1-1239-2	IVa
Nec1-333-1	IVb	Nec1-1302-2	IVa
Nec1-341-10	IVa	Nec2-1409-12	IVa
Nec1-445-4	IVa	Nec2-1613-3	IVb
Nec1-458-6	IVa	Nec2-1625-4	VIa
Nec1-470-2	IVa	Nec3-1908-4	VIa
Nec1-520-1	VIb	Nec5-532-1	IVa
Nec1-522-2	VIa	Nec6-940-7	IVa
Nec1-530-1	VIb	Nec8-4116-8	VIIa
Nec1-538-3	VIa	Nec9-143-3	VIIb
Nec1-554-1	IVb	Nec9-136-1	VIIb
Nec1-555-5	IVa	Nec9-1004-1	VIIa
Nec1-726-1	IVa	Nec9-1018-1	VIIb
Nec1-759-9	VIa	Nec9-1236-1	VIIa
Nec1-765-1	VIa	Nec9-1502-2	VIc
Nec1-803-2	VIb	Nec9-1637-1	VIIa
Nec1-812-4	IVa	Nec10-1666-1	VIb
Nec1-831-4	IVa	Nec10-1707-3	VIb
Nec1-834-1	VIc	Nec10-1861-1	VIc
Nec1-835-1	IVa	Nec10-2005-1	VIb
Nec1-845-2	VIb	Nec10-2439-2	VIc

EXAMPLE 19

Base sequences and amino acid sequences of variable regions in anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

The base sequences and amino acid sequences of the variable regions in anti-nectin-2 human monoclonal antibodies Nec1-244-3, Nec1-530-1, Nec1-554-1, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-845-2, Nec1-903-1 and Nec8-4116-8 prepared in EXAMPLE 1 were determined by the following procedures. Specifically, cDNA

was prepared by using SuperScriptIII Cells Direct cDNA Synthesis System (Invitrogen). The anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridoma established in EXAMPLE 1 (3 to 10 x 10^5 cells) was suspended in 80 μL of PBS, and 1 μL of the suspension was added on ice to a PCR tube charged with 1 μL of RNaseOUT and 10 μL of Resuspension Buffer, which was heated at 75°C for 10 minutes. Next, 1.6 μL of 10 x DNaseI Buffer and 5 μL of DNaseI were added thereto on ice and the mixture was allowed to stand at room temperature for 5 minutes. Then, the tube was put back on ice and 1.2 μL of 25 mM EDTA was added thereto, followed by heating at 70°C for 5 minutes. Subsequently, 2 μL of Oligo$(dT)_{20}$ and 1 μL of 10 mM dNTP Mix were added thereto. After heating at 70°C for 5 minutes, the tube was allowed to stand on ice for 2 minutes, and 6 μL of 5 x RT Buffer, 1 μL of RNase OUT, 1 μL of SuperScriptIII RT and 1 μL of 0.1 mM DTT were added thereto. The resulting mixture was reacted at 50°C for 50 minutes and further at 85°C for 5 minutes to synthesize cDNA.

Using the above cDNA synthesized from each hybridoma as a template, PCR was carried out to amplify the H chain genes using primer 176 (SEQ ID NO: 176) and primer 177 (SEQ ID NO: 177) and the L chain genes using primer 178 (SEQ ID NO: 178) and primer 179 (SEQ ID NO: 179), in the case of Nec1-244-3, Nec1-530-1, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-845-2 and Nec1-903-1; the H chain gene using primer 177 and primer 178 and the L chain gene using primer 180 (SEQ ID NO: 180) and primer 179, in the case of Nec8-4116-8; and the H chain gene using primer 181 (SEQ ID NO: 181) and primer 177 and the L chain gene using primer 182 (SEQ ID NO: 182) and primer 179, in the case of Nec1-554-1; respectively. In this reaction, the reaction solution was composed of 4 μL of the cDNA described above, 1 U of KOD-Plus- (TOYOBO), 0.3 μM of each primer, 200 μM dNTPs, 1 mM $MgSO_4$ and 10 x PCR buffer (TOYOBO), which was made the total 50 μL. PCR was carried out by reacting at 94°C for 2 minutes and then repeating 30 times the cycle set to include 94°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute. The H chain genes were again subjected to the same PCR as described above, using 1 μL of the reaction solution after completion of abovementioned PCR as a template. The PCR product was purified using PCR Purification Kit (QIAGEN) and eluted with 75 μL of EB buffer.

The PCR reaction for DNA base sequencing was carried out by using a solution of 20 μL volume composed of 10 μL of the purified PCR production solution described above, 8 μL of ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle

Sequencing Kit Cycle Sequencing Mix (Applied Biosystems) and 3.2 pmol of primer 183 (SEQ ID NO: 183). PCR was carried out by reacting at 96°C for 2 minutes and then repeating 25 times the cycle set to include 96°C for 10 seconds, 50°C for 5 seconds and 60°C for 4 minutes. The reaction solution was purified by replacing with 30 μL of distilled water using Sephadex G-75 Superfine (GE healthcare Bio-sciences). This reaction product was applied to DNA sequence analyzer ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) and the DNA sequence was determined based on the manual attached to the analyzer. The amino acid sequence of each antibody was deduced from the DNA sequence in a conventional manner.

The results revealed that the H chain variable region of Nec1-244-3 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 191) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 187, the L chain variable region of Nec1-244-3 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 199) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 195, the H chain variable region of Nec1-530-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 207) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 203, the L chain variable region of Nec1-530-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 215) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 211, the H chain variable region of Nec1-554-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 223) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 219, the L chain variable region of Nec1-554-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 231) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 227, the H chain variable region of Nec1-803-2 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 239) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 235, the L chain variable region of Nec1-803-2 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 247) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 243, the H chain variable region of Nec1-834-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 255) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 251, the L chain variable region of Nec1-834-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 263) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 259, the H chain variable region of Nec1-845-2 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 271) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 267, the L chain variable region of Nec1-845-2 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 279) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 275, the H chain variable region of Nec1-903-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 287) encoding the amino acid sequence

represented by SEQ ID NO: 283, the L chain variable region of Nec1-903-1 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 295) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 291, the H chain variable region of Nec8-4116-8 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 303) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 299, and the L chain variable region of Nec8-4116-8 consisted of the base sequence (SEQ ID NO: 311) encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 307.

The combinations of CDR1 to 3 (amino acid sequences) of the heavy chains of the antibodies obtained here are listed in TABLE 21. The combinations of CDR1 to 3 (amino acid sequences) of their light chains are listed in TABLE 22. The CDR1 to 3 (base sequences) of the heavy chains of the antibodies obtained here are base sequences encoding the amino acid sequences described in TALBE 21 and their combinations are listed in TABLE 23. The CDR1 to 3 (base sequences) of the light chains of the antibodies obtained here are base sequences encoding the amino acid sequences described in TALBE 22 and their combinations are listed in TABLE 24.

In addition, the amino acid sequences and base sequences of the variable regions of the antibodies obtained here are listed in TABLE 25.

For reference, the amino acid sequences of the H chain and L chain variable regions of these antibodies are shown in FIG. 1 and the respective base sequences are shown in FIGS. 2 and 3.

TABLE 21 CDR Sequence (amino acid sequence) of Heavy Chain of Anti-Nectin-2 Antibody

Clone No.	Heavy Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	SYYWS (184)	YIYYSGSTNHNPSLKS (185)	DGGDDYNYGMDV (186)
Nec1-530-1	SYYWT (200)	YVYYSGSTNYNPSLKS (201)	DPGEDYYYGMDV (202)
Nec1-554-1	SYNMN (216)	SISSSSSYIYYADSVKG (217)	DYYGSGTYYLFDY (218)
Nec1-803-2	SYYWT (232)	YIYYSGSTNSNPSLKS (233)	DPGEDYNYGMDV (234)

Nec1-834-1	SYYWS (248)	YIYYSGSTNYNPSLKS (249)	DAGEDYSYGMDV (250)
Nec1-845-2	SYYWT (264)	YIYYSGSTNYNPSLKS (265)	DPGEDYNYGMDV (266)
Nec1-903-1	SYXWT (280)	YIYYSGSTNYNPSLKS (281)	DPGEDYNYGMDV (282)
Nec8-4116-8	SYYWT (296)	YIFYSGSTNYNPSLKS (297)	GIAGMDV (298)

Numerals within parentheses following the sequences denote Sequencing Numbers.

TABLE 22 CDR Sequence (amino acid sequence) of Light Chain of Anti-Nectin-2 Antibody

Clone No.	Light Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	RASQGISSXLA (192)	DASSLXS (193)	QQXNSYPXT (194)
Nec1-530-1	RASQGISSXLA (208)	DASSLES (209)	QQFNSYPRT (210)
Nec1-554-1	RASQSIGSSLH (224)	YASQSFS (225)	HQSRSLPIT (226)
Nec1-803-2	RASQGISSALA (240)	DASSLES (241)	QQFNSYPRT (242)
Nec1-834-1	RASQGISSALA (256)	DASSLES (257)	QQFNSYRT (258)
Nec1-845-2	RASQGISSALA (272)	DASSLES (273)	QQFNSYPRT (274)
Nec1-903-1	RASQGISSALA (288)	DASSLES (289)	QQFNSYPRT (290)
Nec8-4116-8	RASQSIGSSLH (304)	YASQSFS (305)	HQSRSLPIT (306)

Numerals within parentheses following the sequences denote Sequencing Numbers.

TABLE 23 CDR Sequence (base sequence) of Heavy Chain of Anti-Nectin-2 Antibody

Clone No.	Heavy Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	AGTTACTACTGGAGC (188)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACCACAAC CCCTCCCTCAAGAGT (189)	GATGGTGGGGACGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (190)
Nec1-530-1	AGTTACTACTGGACC (204)	TATGTCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (205)	GACCCTGGGGAAGAC TACTACTACGGTATG GACGTC (206)
Nec1-554-1	AGCTATAACATGAAC (220)	TCCATTAGTAGTAGTAG TAGTTACATATACTACG CAGACTCAGTGAAGGGC (221)	GATTACTATGGTTCG GGGACTTATTATCTC TTTGACTAC (222)
Nec1-803-2	AGTTACTACTGGACC (236)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTCCAAC CCCTCCCTCAAGAGT (237)	GACCCTGGGGAAGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (238)
Nec1-834-1	AGTTACTACTGGAGC (252)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (253)	GATGCTGGGGAGGAC TACTCCTACGGTATG GACGTC (254)
Nec1-845-2	AGTTACTACTGGACC (268)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (269)	GACCCTGGGGAAGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (270)
Nec1-903-1	AGTTACWACTGGACC (284)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (285)	GACCCTGGGGAAGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (286)
Nec8-4116-8	AGTTACTATTGGACC (300)	TATATCTTTTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (301)	GGTATAGCAGGTATG GACGTC (302)

Numerals within parentheses following the sequences denote Sequencing Numbers.

TABLE 24 CDR Sequence (base sequence) of Light Chain of Anti-Nectin-2 Antibody

Clone No.	Light Chain		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	CGGGCRAGTCAGGGCATTAGCAGYGSKTTAGCC (196)	GATGCMTCCAGTTTGSAAAGT (197)	CAACAGTWTAATAGTTACCCTYGGACG (198)
Nec1-530-1	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGSTTTAGCC (212)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (213)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (214)
Nec1-554-1	CGGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGCTTACAC (228)	TATGCTTCCCAGTCCTTCTCA (229)	CATCAGAGTAGGAGTTTACCGATCACC (230)
Nec1-803-2	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC (244)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAG (245)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (246)
Nec1-834-1	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC (260)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (261)	CAACAGTTTAATAGTTACCGGACG (262)
Nec1-845-2	CGGGCRAGTCAGGGYATTAGCAGYGCTTTAGCC (276)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (277)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (278)
Nec1-903-1	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC (292)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (293)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (294)
Nec8-4116-8	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCC (308)	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT (309)	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGTACACT (310)

Numerals within parentheses following the sequences denote Sequencing Numbers.

TABLE 25 Base Sequence and Amino Acid Sequence of Anti-Nectin-2 Antibody Variable Regions

Clone No.	Base Sequence		Amino Acid Sequence	
	Heavy Chain	Light Chain	Heavy Chain	Light Chain
Nec1-244-3	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 187	SEQ ID NO: 195
Nec1-530-1	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 211
Nec1-554-1	SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 219	SEQ ID NO: 227
Nec1-803-2	SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 247	SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 243

Nec1-834-1	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 251	SEQ ID NO: 259
Nec1-845-2	SEQ ID NO: 271	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 275
Nec1-903-1	SEQ ID NO: 287	SEQ ID NO: 295	SEQ ID NO: 283	SEQ ID NO: 291
Nec8-4116-8	SEQ ID NO: 303	SEQ ID NO: 311	SEQ ID NO: 299	SEQ ID NO: 307

The human monoclonal antibody against the protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, can be safely used, for example, as an agent for preventing/treating cancer (e.g., colorectal cancer, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, esophageal cancer, gastric cancer, liver cancer, biliary tract cancer, spleen cancer, renal cancer, bladder cancer, uterine cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer, brain tumor, blood tumor, etc.) (preferably an agent for preventing/treating breast cancer, lung cancer, colorectal cancer, prostate cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, etc.), an apoptosis inducer of cancer cells, a growth inhibitor of cancer cells, an inducer of cell cycle change in cancer cells, an effector cell-dependent cytotoxic agent against cancer cells, and the like.

REFERENCE EXAMPLE 36

Generation of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies

(i) A recombinant nectin-2ED-hFc fusion protein (1.6 mg/mL PBS solution) prepared in REFERENCE EXAMPLE 16 in which an animal cell expression vector encoding the fusion protein of nectin-2δ extracellular domain (Met^{1}-Gly^{361}) and human IgG_1 antibody Fc region (Pro^{217}-Lys^{447}) were transiently expressed in human 293F cell line (Invitrogen); or (ii) a recombinant nectin-2ED-FLAG fusion protein (2 mg/mL PBS solution) prepared inREFERENCE EXAMPLE 13 in which an animal cell expression vector encoding the fusion protein of nectin-2δ extracellular domain (Met^{1}-Gly^{361}) and FLAG tag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) were transiently expressed in human 293F cell line (Invitrogen), was mixed with Freund's complete adjuvant (Difco) in equal volumes to prepare emulsions, respectively.

These emulsions were injected to each five KM mice (10 weeks old, 12 weeks old, male; Kirin Brewery) subcutaneously and intracutaneously for primary immunization, respectively, in 10 to 50 μg each/animal. For the second and

L94

subsequent immunization, an emulsion prepared by mixing the recombinant nectin-2ED-hFc protein or the recombinant necin-2ED-FLAG protein with Freund's incomplete adjuvant (Difco) in equal volumes was likewise injected every 2 weeks for booster. In addition, recombinant FM3A cell line (#60-6) (cf. PCT/JP2006/320429) stably expressing nectin-2δ or recombinant NS0 cell line (#2-75) stably expressing nectin-2δ was cultured in a flask. These cells were collected and washed to remove the serum components, followed by treating with mitomycin C (Wako Pure Chemical) at 37°C for 30 minutes. The two cell lines treated with mitomycin C were washed 3 times with 10 mL of PBS and then resuspended in PBS at 2 x 10^7cells/mL. The suspension was intraperitoneally injected to each five KM mice (Kirin Brewery, 10-12 weeks old, male) at 1 x 10^7 cells/500 μL repeatedly once every week.

Also, each five KM mice (12 weeks old, male) were immunized for primary immunization, with an emulsion prepared by mixing the aforesaid recombinant Nectin-2ED-hFc protein or the aforesaid recombinant Nectin-2ED-FLAG protein with Freund's complete adjuvant in equal volumes subcutaneously and intracutaneously at 10 to 50 μg each/animal, respectively. One week after the primary immunization, the mitomycin C-treated recombinant FM3A cell line expressing nectin-2δ was intraperitoneally injected at 1 x 10^7 cells each/500 μL for booster. For the third immunization, an emulsion prepared by mixing the recombinant nectin-2ED-hFc or the recombinant nectin-2ED-FLAG with Freund's incomplete adjuvant in equal volumes was subcutaneously and intracutaneously immunized, respectively, and at the same time, mitomycin C-treated recombinant FM3A cell line expressing nectin-2δ (#60-6) was intraperitoneally injected at 1 x 10^7 cells each/500 μL once every week. For the fourth and subsequent immunization, the mitomycin C-treated recombinant FM3A cell line (#60-6) expressing nectin-2δ only was intraperitoneally injected at 1 x 10^7 cells each/500 μL by the same procedure as described above.

Prior to the immunization and after the immunization, blood was collected from the ocular fundus of all mice under ethereal anesthesia to prepare antisera, and the antibody titer in the sera was determined by the flow cytometry method described below. That is, cell suspensions (PBS) of the recombinant CHO cell line (#43-2) stably expressing nectin-2δ (cf. PCT/JP2006/320429) and mock-CHO cell line were separately dispensed in polypropylene tubes at 5 x 10^5 cells/tube, respectively, and then PBS was removed by centrifugation (1,200 rpm x 5 minutes). These cell

debris were resuspended in 50 μL each of the aforesaid mouse antisera diluted to 100-fold with PBS containing 1% BSA and 10% FBS, and reacted on ice in the dark for 30 minutes. After 200 μL of PBS was added to the cell debris and the mixture was centrifuged (1,200 rpm x 5 minutes), the supernatant was removed by aspiration. The cell debris were resuspended in 50 μL of a solution of anti-human IgG (H+L) Alexa 488 (Invitrogen) diluted to 100-fold with PBS containing 1% BSA and 10% FBS, and reacted on ice in the dark for 30 minutes. After the cell suspension was likewise washed 3 times with PBS, the cell debris was resuspended in 200 μL of PBS. Fluorescence intensities of the respective cells were analyzed with the flow cytometer MPL500 (BECKMAN COULTER) to prepare a graph having an abscissa representing the fluorescence intensity and an ordinate representing the cell count, whereby antibody titers of antisera were compared.

In the KM mice in which a sufficient increase in the serum antibody titer was confirmed by the procedure described above, the mice which had been immunized with the recombinant nectin-2ED-hFc or the recombinant nectin-2ED-FLAG were injected via tail vein with these protein antigens, and the mice which had been immunized with the recombinant cell line stably expressing nectin-2δ were intraperitoneally injected with the same cell line . Three days after the final immunization, the mice were bled to death and spleen was withdrawn. The mouse spleen cells obtained were mixed in 5 : 1 with mouse myeloma cells P3X63Ag8U.1 (P3U1) (ATCC), which had previously been adapted to a medium in which 1 vial of 8-azaguanine (HybriMax, Sigma-Aldrich) per 500 mL of 10% FBS-supplemented Daigo T medium (a medium mixture of F-12 Nutrient Mixture (HAM) (Invitrogen) and Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen) in equal volumes, supplemented with MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Invitrogen), sodium pyruvate (Invitrogen) and L-glutamine (Invitrogen)) thereby to cause fusion using polyethylene glycol (PEG) 1,500 (Roche Diagnostics). Cell fusion manipulations were performed according to the manual attached to the reagent. The cells after fusion were resuspended in Daigo T medium supplemented with 10% FBS and 10% BM Condimed H1 (Roche Diagnostics), seeded in a 96-well culture plate at 5×10^4 spleen cells/100 μL/well and incubated at 37°C for a day in a 5% carbon dioxide gas flow. Subsequently, Daigo T medium (HAT selection medium) supplemented with 0.1 mM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 0.016 mM thymidine (HAT), 10% BM Condimed H1 and 10% FBS was added thereto at 100 μL/well, followed by a further incubation at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow with

replacing twice 3/4 of the culture supernatant with a fresh HAT selection medium every 3 days.

The culture supernatant in which growth of the colony was observed during days 7 to 14 of the incubation was screened by Cell ELISA using the recombinant CHO cell line stably expressing nectin-2δ (#43-2) or the mock-CHO cell line to establish the anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridoma. In other words, the recombinant CHO cell line stably expressing nectin-2δ (#43-2) and the mock-CHO cell line were incubated in a 96-well tissue culture plate charged with GS-selection DMEM medium containing 10% dialyzed FBS and GS supplements. After the culture supernatant of the plate where each cell line became confluent was removed by aspiration, 200 μL each/well of PBS(+) containing 2% FBS was added thereto and incubated on ice in the dark for an hour. After the supernatant of each well was removed by aspiration, 50 μL each/well of the hybridoma culture supernatant was added and reacted on ice in the dark for 2 hours. After this plate was washed once with PBS(+) chilled at 4°C, 100 μL each/well of anti-human IgG (H+L) chain specific (GOAT) peroxidase conjugate (CALBIOCHEM) diluted to 3,000-fold with PBS(+) containing 2% FBS was added and reacted on ice in the dark for 2 hours. After the plate was washed 3 times with PBS(+) chilled at 4°C, 100 μL each/well of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution (SureBlue Microwell TMB peroxidase substrate; Kirkegaard & Perry Laboratories) was added and maintained at room temperature for 5 minutes to cause color formation. By adding 100 μL each/well of 2N sulfuric acid (Wako Pure Chemical) , the enzyme reaction was terminated. Absorbance (450 nm) of each well was measured using a plate reader (Multiskan BICHROMATIC; Thermo Electron Co.), and those showing absorbance of 0.5 or more in the plate in which the nectin-2 expression recombinant CHO cells expressing nectin-2 were seeded and showing absorbance of less than 0.3 in the plate in which the mock-CHO cell line were seeded were determined to be positive wells. IgG antibody-producing The hybridomas producing IgG antibody with particularly high antigen specificity and affinity were selected, and resuspended in Daigo T medium containing 10% FBS and 10% BM Condimed H1. The cells were seeded in a 96-well tissue culture plate at 0.5 cell/well,and the culture supernatants of the hybridomas, which were confirmed to be monoclones by microscopic observation, were again screened by the Cell ELISA described above to establish 258 hybridoma clones producing anti-nectin-2 human monoclonal antibody.

The thus obtained each anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing

hybridoma was cultured in flask charged with 100 mL of Daigo T medium containing 10% FBS Ultra low IgG (Invitrogen), and the culture supernatant was centrifuged (1,200 rpm x 5 minutes) to give the supernatant. After 200 μL of Protein A Sepharose FF (GE Healthcare Bio-sciences) equilibrated with PBS was added to these culture supernatant, the antibody was adsorbed thereto while gently shaking overnight at 4°C. This protein A carrier was recovered and washed with PBS by centrifugal operation. Then, the IgG fraction was eluted out with 1.2 mL of 0.1 M glycine-HCl (pH 3.0) containing 0.3 M NaCl. Immediately, this eluate was neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 8.0), and the buffer was replaced with PBS by ultraconcentration using an ultrafiltration membrane (Vivaspin 6: molecular weight cut off, 10,000; Sartorius), which was used in the following *in vitro* characterizations as the anti-nectin-2 human monoclonal antibody preparation.

The hybridoma clone Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682), Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), Nec1-1044-4, Nec8-3517-11 or Nec8-3704-7, which produce the antibody used in the present invention, was obtained from the antibody-producing hybridoma clones.

REFERENCE EXAMPLE 37

Selection of antibodies binding to nectin-2 competitively with the antibody used in the present invention

The monoclonal antibodies binding to nectin-2 competitively with the antibody used in the present invention, which was prepared in REFERENCE EXAMPLE 36, were selected by the procedures described below.

First, to perform the competitive binding inhibition reaction between the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies against nectin-2, the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies obtained in REFERENCE EXAMPLE 36 were biotinylated. That is, 10 μg of the anti-nectin-2 human monoclonal antibody was added to 50 μL of WS Buffer attached to Biotin Labeling Kit-NH2 (Dojindo) and the mixture was concentrated almost to dryness by ultrafiltration using Microcon YM50 (MILLIPORE). To the liquid residue, 50 μL of Reaction Buffer attached to Biotin Labeling Kit-NH2 and a solution of 4 μL of NH2 Reactive Biotin dissolved in 50 μL

of DMSO were added sequentially in this order, followed by reaction at 37°C for 10 minutes. The buffer of the reaction mixture was again replaced with WS Buffer by ultrafiltration to prepare biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibodies. These antibodies were used for the assay described below.

To FMAT plate (384 well plate Black/Clear Bottom with Lid; Applied Biosystems), 5 μL of the antibody used in the present invention (unlabeled anti-nectin-2 monoclonal antibody), which was prepared in REFERENCE EXAMPLE 36, diluted in PBS containing 2% FBS at 25 μg/mL, 15 μL of a cell suspension (2 x 10^5 cells/mL) of the CHO cell line stably expression nectin-2δ (#43-2) in PBS containing 2% FBS, and 5 μL of Streptavidin-Alexa Fluor 647 conjugate (Invitrogen) were added and mixed with each other, followed by reacting them at room temperature for 10 minutes. After adding 5 μL of the biotinylated anti-nectin-2 human monoclonal antibody prepared by the procedure described above, diluted in PBS containing 2% FBS at 0.5 μg/mL to each well, the plate was incubated at room temperature for 60 minutes. For control runs, wells in which PBS containing 2% FBS was added in place of the solution of unlabeled anti-nectin-2 monoclonal antibody were provided. This competitive inhibition reaction against the binding to nectin-2 was examined with the all combinations of the antibodies provided for the biotinylation and the antibodies used in the present invention. The plate was set on the Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems) to measure the fluorescence intensity (total FL1 value) of each well. The competitive inhibition rate in the combination of each anti-nectin-2 human monoclonal antibody was calculated according to the formula shown below.

Competitive binding inhibition rate = (1-A/B) x 100

A: Total FL1 value of the well in which the unlabeled antibody is added to an antibody tested

B: Total FL1 value of the well in which the unlabeled antibody is not added to an antibody tested

By this procedure, for example, Nec1-1044-4 and Nec1-1302-2 were selectively obtained from the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies prepared in, e.g., REFERENCE EXAMPLE 36 as the antibodies which bind to nectin-2 competitively with Nec1-554-1 for binding. Also, e.g., Nec8-3704-7 and

Nec8-3517-11 were selectively obtained as the antibodies which bind to nectin-2 competitively with Nec8-4116-8.

TABLE 26 shows the rate of inhibiting the binding between biotinylated Nec8-4116-8 and nectin-2 by the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies.

TABLE 27 shows the competitive binding inhibition rate by the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies against the binding to biotinylated Nec1-554-1 and nectin-2.

The antibodies Nec1-1044-4 and Nec1-1302-2, and Nec8-3704-7 and Nec8-3517-11, which bind to nectin-2 competitively with the thus selected antibodies used in the present invention, have been deposited, respectively.

TABLE 26

Biotinylated Antibody	Unlabeled Antibody	Inhibition Rate (%)
Nec8-4116-8	Nec8-3517-11	91
Nec8-4116-8	Nec8-3704-7	98
Nec8-4116-8	Nec8-4116-8	98
Nec8-4116-8	Nec1-244-3	0
Nec8-4116-8	Nec1-845-2	22
Nec8-4116-8	Nec1-520-1	48
Nec8-4116-8	Nec1-769-2	0

TABLE 27

Biotinylated Antibody	Unlabeled Antibody	Inhibition Rate (%)
Nec1-554-1	Nec1-554-1	87
Nec1-554-1	Nec1-1044-4	92
Nec1-554-1	Nec1-1302-2	82
Nec1-554-1	Nec1-244-3	0
Nec1-554-1	Nec1-845-2	0
Nec1-554-1	Nec1-520-1	41
Nec1-554-1	Nec1-769-2	0

REFERENCE EXAMPLE 38

Large scale preparation of recombinant anti-nectin-2 human monoclonal antibody (Nec8-4116-8)

Recombinant anti-nectin-2 human monoclonal antibody (Nec8-4116-8) was

prepared by stably expressing a gene for the antibody in CHOK1SV cell line (Lonza Biologics). The antibody preparation which had been purified from the culture supernatant of anti-nectin-2 human monoclonal antibody-producing hybridoma Nec8-4116-8 using a Protein A column, was applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions to separate the H and L chains. The H and L chain proteins were transferred onto PVDF membrane. Since the H chain was often pyroglutamated at the N-terminus, the removal of the pyroglutamate was performed using Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase (Takara Bio). The N-terminal amino acid sequences of the proteins transferred onto PVDF membrane were sequenced using a protein sequencer (ABI). The thus obtained N-terminal amino acid sequences (H chain (SEQ ID NO: 312) and L chain (SEQ ID NO: 313)) were subjected to homology search using the V BASE database (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) thereby to select the germline (VH4, VKIIIA27) coincident with the amino acid sequences described above and the base sequences (H chain (SEQ ID NO: 314) and L chain (SEQ ID NO: 315)) encoding the N-terminus of the putative signal sequences therefrom. Restriction enzyme Hind III site and Kozak sequence were added to these signal sequences to synthesize oligo DNAs as forward primers (H chain (SEQ ID NO: 176) and L chain (SEQ ID NO: 180)). On the other hand, oligo DNAs with restriction enzyme EcoRI site added downstream the termination codons of genes for antibody H and L chains were synthesized as reverse primers, respectively (H chain (SEQ ID NO: 316) and L chain (SEQ ID NO: 317)). Using a cDNA prepared from hybridoma cell (Nec8-4116-8) using SuperScriptIII Cells Direct cDNA Synthesis System (Invitrogen) as a template, PCR was performed using the primers described above to obtain the full length genes for the H and L chains of Nec8-4116-8 antibody, respectively.

The thus obtained H chain gene and the L chain gene were digested with restriction enzymes HindIII and EcoRI, respectively. The purified DNA fragments were inserted into the animal cell expression vector pEE6.4 (Lonza Biologics) and the animal cell expression vector pEE12.4 (Lonza Biologics) containing glutamine synthetase (GS) gene at the Hind III - EcoR I site, respectively to construct the H chain expression vector and the L chain expression vector. Also, the H chain gene-inserted fragment and the L chain gene-inserted fragment, which were excised from the respective vectors by digestion with restriction enzymes Not I/Sal I, were isolated and then ligated each other to construct the double gene vector bearing the GS gene, H chain gene and L chain gene altogether. This vector was transfected

into CHOK1SV cells according to the Lonza Biologics' manual and the transfectant was selection-cultured in a 96-well tissue culture plate containing Methionine Sulphoximine (MSX). Human antibody concentrations in the culture supernatants from the wells where a single colony was grown was quantified by ELISA to select 22 recombinant cell lines stably expressing Nec8-4116-8. These cell lines were expanded, and then adapted to a suspension culture using serum-free medium. Thus, the CHOK1SV cell line (Clone 25-78) stably expressing Nec8-4116-8 which shows excellent cell growth and antibody productivity was established.

The CHOK1SV cell line described above was expanded in a ProCHO5 medium (Cambrex) containing 25 μM methionine sulphoximine (MP Biomedicals) and GS supplement (50 x, SAFC), and cultured at 37°C in a 5 % carbon dioxide gas flow, followed by a stirring culture for 32 days using a 2 L jar fermentor (37°C, dissolved oxygen concentration of 2 mg/L, pH of 6.7-7.0, rotation speed of 80 rpm, aerated at 100-300mL/min). During this period, glucose solution, L-glutamine solution, GS supplement (50 x, SAFC), amino acids (50 x, SAFC), trace elements (10,000 x, SAFC), vitamins (100 x, SAFC) and soy hydrolysate (50 x, SAFC) were added based on the component analysis of the medium. The main culture was terminated at the point of time when cell viability was decreased to about 10%.

Next, the culture supernatant was centrifuged (7,460 x g, 20 minutes) to harvest the supernatant. The supernatant was concentrated through an ultrafiltration membrane (Hydrosart membrane, molecular weight cut-off of 10,000; Sartorius AG) for buffer exchange to 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl. The concentrate was centrifuged (14,300 x g, 20 minutes) to obtain the supernatant, which was further microfiltrated (Stericup HV, 0.45 μm; Millipore) to obtain the concentrate. The concentrate was adsorbed to a Protein A Sepharose column (22 mm ID x 79 mm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl. After washing the column with 20 column volume of the same buffer, the antibody fraction adsorbed to the column was eluted out with 0.1 M sodium citrate buffer (pH 3.0). Immediately thereafter, the fraction was neutralized by adding 1/10 volume of 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) and concentrated using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 30,000; Millipore). The concentrate was applied onto the Superdex 200 column (26 mm ID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS and eluted with the same buffer to give the antibody monomer fraction. The antibody fraction was passed through an ActiClean EtOX column (25 mm ID x 59 mm,

Sterogene Bioseparations), which had been equilibrated with PBS, to remove endotoxin, followed by a concentration using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 10,000; Millipore). The concentrate was filtrated aseptically (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) to give the purified recombinant Nec8-4116-8 preparation. The purified antibody thus obtained demonstrated the purity of 95% or higher on SDS-PAGE and gel filtration HPLC using Superdex 200 column. The endotoxin content in the antibody preparation was found to be 0.1 EU/mg antibody or less by the analyses using both Endospecy ES-24S Set (Seikagaku Corp.) and Toxicolor DIA Set (Seikagaku Corp.).

REFERENCE EXAMPLE 39

Large scale preparation of anti-nectin-2 human monoclonal antibody (Nec1-554-1)

The anti-nectin-2 human monoclonal antibody Nec1-554-1 was prepared from the said antibody-producing hybridoma cell line (Nec1-554-1) by the following procedure. After expanding the culture of the hybridoma cell line Nec1-554-1 at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow in IH medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium : Ham's F-12 = 1:1, 0.1 mM MEM non-essential amino acid solution, 1 mM sodium pyruvate solution, 2 mM L-glutamine solution; Invitrogen) containing 10% FBS (Ultra-Low IgG, Invitrogen), the cells were further expanded with a primary adaptation medium (IH medium: CD Hybridoma Medium with 8 mM L-glutamine solution = 1:1, Invitrogen), followed by incubation for one day. The cells were further expanded with the medium for main culture (IH medium: CD Hybridoma Medium with 8 mM L-glutamine solution = 1:3, Invitrogen), followed by incubation for 5 to 7 days (37°C, dissolved oxygen concentration of 2 mg/L, pH 7.0, rotation speed of 40 rpm). During this period, glucose solution and L-glutamine solution were added based on the component analysis of the medium. The main culture was terminated at the point of time when cell viability was decreased to about 50%.

Next, the culture supernatant was harvested by centrifugation (7,460 x g, 20 minutes) and concentrated through an ultrafiltration membrane (Hydrosart membrane, molecular weight cut-off, 10,000; Sartorius AG) for buffer exchange to 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.15 M NaCl, followed by a centrifugation (14,300 x g, 20 minutes) to obtain the supernatant. The supernatant was further microfiltrated (Stericup HV, 0.45 μm; Millipore) to obtain the concentrate. The concentrate was adsorbed to a Protein A Sepharose column (22 mm ID x 79 mm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)

containing 0.15 M NaCl. After washing the column with 20 column volume of the same buffer, the antibody fraction adsorbed to the column was eluted out with 0.1 M sodium citrate buffer (pH 3.0). Immediately thereafter, the fraction was neutralized by adding 1/10 volume of 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0).

The purified antibody fraction thus obtained was found to be exceptionally a mixture of the active and inactive antibodies. Therefore, the antibody fraction was diluted to 3-fold with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and further adsorbed to an SP-5PW cation exchange column (21.5 mm ID x 150 mm, Toso) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 100 mM NaCl. After washing the column with about 2 column volume of the same buffer, the antibodies were separated to 3 eluted fractions with a linear gradient of the NaCl concentration from 100 mM to 300 mM over 70 minutes. The binding activities of these eluted fractions to nectin-2 were determined by ELISA using the immobilized recombinant nectin-2-ED-Fc protein, and the antibody fraction (SP3) demonstrating the highest specific activity was collected as an anti-nectin-2 Ab fraction. The thus obtained antibody eluate was concentrated using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 30,000; Millipore), and was applied onto a Superdex 200 column (26 mm ID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrated with PBS and eluted with the same buffer to give the antibody monomer fraction. The fraction was passed through the ActiClean EtOX column (25 mm ID x 59 mm, Sterogene Bioseparations) equilibrated with PBS to remove endotoxin, followed by concentration using an ultrafiltration membrane (AmiconUltra, molecular weight cut-off, 10,000; Millipore), and the concentrate was further filtrated aseptically (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) to give the purified antibody. The purified antibody was named Nec1-554-1 SP3.

The purified antibody thus obtained demonstrated the purity of 95% or higher on SDS-PAGE and gel filtration HPLC using Superdex 200 column. The endotoxin content in the antibody preparation was found to be 0.1 EU/mg antibody or less by the analyses using both Endospecy ES-24S Set (Seikagaku Corp.) and Toxicolor DIA Set (Seikagaku Corp.).

EXAMPLE 20

ADCC of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies against breast cancer cell line

ADCC of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies Nec1-554-1,

Nec1-1044-4, Nec1-1302-2, Nec8-4116-8, Nec8-3517-11 and Nec8-3704-7 prepared in REFERENCE EXAMPLES 36 and 37 was measured. Human breast cancer cell line MDA-MB-231 (ATCC) cultured according to the procedure described in EXAMPLE 22 was used as target cells, and commercially available frozen human peripheral blood mononuclear cells (ALLCELLS) which had been cultured overnight in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 0.1 nM recombinant human IL-2 (DIACLONE Research), 55 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen) and 10% fetal bovine serum (FBS) (JRH) (hereinafter referred to as 10% FBS/RPMI 1640 medium) were used as effector cells. As Nec1-1044-4, Nec1-1302-2, Nec8-4116-8, Nec8-3517-11 and Nec8-3704-7, the antibody preparations described in REFERENCE EXAMPLE 36 were used and the antibody preparation (Nec1-554-1 SP3) described in REFERENCE EXAMPLE 39 were used as Nec1-554-1, respectively.

Human breast cancer cell line MDA-MB-231 in the logarithmic growth phase was collected, and 250 μCi of $Na_2{}^{51}CrO_4$ (GE Healthcare Bio-sciences) was added to 1.0×10^6 cells, followed by incubation at 37°C for an hour in order to label the cells with ^{51}Cr. The cell line was washed 4 times with 10% FBS/RPMI 1640 medium and resuspended at 1×10^5 cells/mL in 10% FBS/RPMI 1640 medium. ADCC assay was then performed by adding 50 μL (5×10^3 cells) of the cell suspension thus obtained and 25 μL of a solution in which the antibodies described above were diluted in 10% FBS/RPMI 1640 at final concentrations of 0.0015 μg/mL, 0.015 μg/mL, 0.15 μg/mL and 1.5 μg/mL, to each well of a 96-well RMC plate (BIOBIK). The same volume of non-immune human IgG (final concentration of 0.0015 μg/mL, 0.015 μg/mL, 0.15 μg/mL and 1.5 μg/mL) or D-PBS (Invitrogen) was added as a negative control for detecting non-specific activity when no antibody was added (No Ab). After incubating these plates on ice for an hour, 2.5×10^5 cells each/well of the effector cell suspension described above was added (effector cells : target cells = 50 : 1) and reacted at 37°C for 4 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. The radioactivity (sample release) leaked from the cells in each well to the culture supernatant was measured by a scintillation counter (TopCount NXT). That is, the cell suspension after the reaction was transferred to a Multi-screen 0.45 μm (Millipore) and centrifuged to collect the culture supernatants. After 50 μL of the each culture supernatant was mixed with 150 μL/well of MicroScinti-40 in a 96-well plate (Costar) at room temperature for 30 minutes, the fluorescence of each well was measured by a scintillation counter (TABLE 33). The maximum cytotoxicity

(maximum release) of ADCC was defined as the radioactivity detected when Triton-X 100 (Sigma) was added at a final concentration of 1%, whereas the spontaneous release activity (spontaneous release) was defined as the radioactivity detected when 10% FBS/RPMI 1640 medium was added in place of the effector cells. The specific lysis (%) as an indicator of the ADCC intensity was calculated by ([sample release]-[spontaneous release])/([maximum release]-[spontaneous release]) x 100.

TABLE 33

Antibody	Antibody (μg/ml)	Specific lysis (%)
Non-immune IgG	0.0015	7
	0.015	9
	0.15	8
	1.5	7
No Ab	-	6
Nec1-554-1	0.0015	8
	0.015	11
	0.15	16
	1.5	16
Nec1-1044-4	0.0015	10
	0.015	9
	0.15	9
	1.5	14
Nec1-1302-2	0.0015	8
	0.015	8
	0.15	11
	1.5	14
Nec8-4116-8	0.0015	8
	0.015	11
	0.15	15
	1.5	16

Nec8-3517-11	0.0015	10
	0.015	12
	0.15	15
	1.5	17
Nec8-3704-7	0.0015	9
	0.015	12
	0.15	16
	1.5	16

EXAMPLE 21

ADCC of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies against human prostate cancer cell line, human lung cancer cell line and human blood cancer cell line

ADCC of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies Nec1-554-1 and Nec8-4116-8 prepared in REFERENCE EXAMPLE 36 were measured. Human lung cancer cell line NCI-H1299, human prostate cancer cell line Du145 and human blood cancer cell line U937 were used as target cells, and commercially available frozen human peripheral blood mononuclear cells (ALLCELLS) which had been cultured overnight in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 0.1 nM recombinant human IL-2 (DIACLONE Research), 55 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen) and 10% fetal bovine serum (FBS) (JRH) (hereinafter referred to as 10% FBS/RPMI 1640 medium) were used as effector cells. Human lung cancer cell line NCI-H1299, human prostate cancer cell line Du145 and human blood cancer cell line U937 were purchased from ATCC. These cell lines were incubated according to a modification of the method recommended by ATCC. The antibody preparation described in REFERENCE EXAMPLE 36 and the antibody preparation (Nec1-554-1 SP3) described in REFERENCE EXAMPLE 39 were used as Nec8-4116-8 and Nec1-554-1, respectively.

The abovementioned cancer cells in the logarithmic growth phase were collected, and 250 μCi of $Na_2{}^{51}CrO_4$ (GE Healthcare Bio-sciences) was added to 1.0 x 10^6 cells, followed by incubation at 37°C for an hour in order to label the cells with ^{51}Cr. These cell lines were washed 4 times with 10% FBS/RPMI 1640 medium and resuspended at 1 x 10^5 cells/mL in 10% FBS/RPMI 1640 medium. ADCC assay was then performed by adding 50 μL (5 x 10^3 cells) of the cell suspension thus obtained and 25 μL of a solution in which the antibodies described above were diluted in 10% FBS/RPMI 1640 medium at final concentrations of 0.0015 μg/mL,

0.015 μg/mL, 0.15 μg/mL and 1.5 μg/mL, to each well of a 96-well RMC plate (BIOBIK). The same volume of non-immune human IgG (final concentration of 0.0015 μg/mL, 0.015 μg/mL, 0.15 μg/mL and 1.5 μg/mL) or D-PBS (Invitrogen) was added as a negative control for detecting non-specific activity when no antibody was added (No Ab). After incubating these plates on ice for an hour, 2.5×10^5 cells each/well of the effector cell suspension described above was added (effector cells : target cells = 50 : 1), which was reacted at 37°C for 4 hours in a 5% carbon dioxide gas flow. The radioactivity (sample release) leaked from the cells in each cell was measured using a scintillation counter (TopCount NXT) by the same procedure as described in EXAMPLE 20 (TABLE 34). The maximum cytotoxicity (maximum release) of ADCC was defined as the radioactivity detected when Triton-X 100 (Sigma) was added at a final concentration of 1%, whereas the spontaneous release activity (spontaneous release) was defined as the radioactivity detected when 10% FBS/RPMI 1640 medium was added in place of the effector cells. The specific lysis (%) as an indicator of the ADCC intensity was calculated by ([Sample release]-[Spontaneous release])/([Maximum release]-[Spontaneous release]) x 100.

TABLE 34

Antibody	Antibody (μg/ml)	Specific lysis for NCI-H1299 (%)	Specific lysis for Du145 (%)	Specific lysis for U937 (%)
Non-immune IgG	0.0015	18	9	26
	0.015	23	9	27
	0.15	22	10	27
	1.5	20	9	27
No Ab	-	16	7	21
Nec1-554-1	0.0015	19	10	28
	0.015	24	13	27
	0.15	28	14	36
	1.5	26	16	34
Nec8-4116-8	0.0015	21	9	28
	0.015	23	12	28
	0.15	28	15	36

208

	1.5	29	15	32

EXAMPLE 22

In vivo anti-tumor activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies (SCID mouse models for treating lung metastasis with MDA-MB-231 human breast cancer cell line)

The anti-tumor activities of the anti-nectin-2 human monoclonal antibodies (Nec8-4116-8 and Nec1-554-1) prepared in REFERENCE EXAMPLE 36 were evaluated in SCID mouse models for treating lung metastasis with MDA-MB-231 human breast cancer cell line (purchased from ATCC). The Nec8-4116-8 and Nec1-554-1 antibody preparations used were those prepared by the procedures described in REFERENCE EXAMPLES 38 and 39, respectively. The MDA-MB-231 cell line was seeded on a 10 cm tissue culture dish (Corning) using Leibovitz's L-15 (Invitrogen) containing 10% FBS (Thermo Electron), and incubated at 37°C without carbon dioxide gas. The MDA-MB-231 cell suspension harvested at the logarithmic growth phase by detachment with trypsin-EDTA treatment was washed 3 times with Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen) by centrifugal operation (1,000 rpm, 3 minutes). The cells thus obtained were resuspended in HBSS at a density of 5×10^6 cells/mL.

SCID mice (C.B-17/Icr-scid/scidJcl) (5 weeks old, female), purchased from CLEA Japan, Inc., were inoculated via tail vein with the MDA-MB-231 cell suspension described above at 200 μL each/animal. On day 14 after the cell inoculation, each animal was weighed and then divided by 5 mice per group to make their mean weight equivalent in each group (about 20 g). In the test for evaluating the anti-tumor activity of Nec1-554-1, the Nec1-554-1 SP3 preparation diluted in PBS to 0.3 mg/mL or 0.03 mg/mL or PBS was injected via tail vein at 10 mL each/kg on days 14, 21, 28, 35, 42 and 49 after the cell inoculation. On the other hand, in the test for evaluating the anti-tumor activity of Nec8-4116-8, the Nec8-4116-8 preparation diluted in PBS to 0.3 mg/mL or 0.03 mg/mL or PBS was injected via tail vein at 10 mL each/kg on days 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 after the cell inoculation.

The anti-tumor activities of Nec1-554-1 and Nec8-4116-8 were evaluated by counting the number of cancer colonies formed in the lungs at the diaphragmatic site. Significance of differences between the test groups were evaluated by the parametric Dunnett multiple comparison test (SAS Preclinical Package Version 5.0).

Both Nec1-554-1 and Nec8-4116-8 inhibited growth of the MDA-MB-231

cells at the lung significantly ($p<0.0001$) at any dose level. The number of cancer colonies (mean ± standard deviation) in the Nec1-554-1 group and the PBS group as well as the significance test values (*P* values) are shown in TABLE 35, and the number of cancer colonies (mean ± standard deviation) in the Nec8-4116-8 group and the PBS group as well as the significance test values (*P* values) are shown in TABLE 36.

TABLE 35

	Number of cancer colonies	*P* value
PBS	234±33	-
Nec1-554-1 3 mg/kg	31±24	<0.0001
Nec1-554-1 0.3 mg/kg	20±6	<0.0001

TABLE 36

	Mean number of cancer colonies	*P* value
PBS	152±46	-
Nec8-4116-8 3 mg/kg	18±10	<0.0001
Nec8-4116-8 0.3 mg/kg	41±23	<0.0001

EXAMPLE 23

In vivo anti-tumor activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibodies (SCID mouse models for treating subcutaneously transplanted MDA-MB-231 human breast cancer cell line)

The anti-tumor activities of Nec8-4116-8 and Nec1-554-1 prepared in REFERENCE EXAMPLE 36 were evaluated in SCID mouse models for treating subcutaneously transplanted MDA-MB-231 human breast cancer cell line (purchased from ATCC). The Nec8-4116-8 and Nec1-554-1 antibody preparations used were those prepared by the procedures described in REFERENCE EXAMPLES 38 and 39, respectively. The MDA-MB-231 cell line was seeded on a 10 cm tissue culture dish (Becton Dickinson) using Leibovitz's L-15 (Invitrogen) containing 10% FBS (Hyclone) and 1/40 volume of 7.5% sodium bicarbonate (Invitrogen), followed by incubation at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. The MDA-MB-231 cell suspension harvested at the logarithmic growth phase by detachment with trypsin-EDTA treatment was washed 3 times with Hank's balanced salt solution

(HBSS) (Invitrogen) by centrifugal operation (1,000 rpm, 3 minutes). The cells thus obtained were resuspended in an equivolume mixture of HBSS and Matrigel (BD Biosciences) to obtain the cell suspension at a density of 3×10^7 cells/mL.

After SCID mice (C.B-17/Icr-scid/scidJcl) (5 weeks old, female), purchased from CLEA Japan, Inc., were tamed for a week, the MDA-MB-231 cell suspension described above was inoculated subcutaneously into the ventral area at a dose of 100 μL each/animal. Ten days after the cell inoculation, the long diameter and short diameter of the MDA-MB-231 tumor mass were measured with calipers and the tumor volume was calculated according to the formula described below.

Tumor volume (mm^3) = long diameter x (short diameter)^2/2

Each SCID mouse inoculated with the MDA-MB-231 cells was weighed and then divided into groups to make the mean volume of tumor mass equivalent (about 170 mm^3) in each group. On days 28, 31, 35, 38 and 42 after the cell inoculation, the Nec8-4116-8 or Nec1-554-1 SP3 antibody solution diluted in PBS to 3 mg/mL or PBS was intravenously administered via tail vein at 10 mL each/kg and at the same time, the tumor volume was measured by the procedure described above. The growth inhibitory activities of Nec8-4116-8 and Nec1-554-1 were evaluated by calculating the T/C (Treatment/Control) value, based on the tumor volume 3 weeks after commencement of drug administration, according to the formula below. Significance differences between the administration groups were evaluated by the parametric Dunnett multiple comparison test (SAS Preclinical Package Version 5.0).

T/C (%) = [(Increased tumor volume in the antibody group from commencement of drug administration)/(Increased tumor volume in the PBS group from commencement of drug administration)] x 100

FIG. 4 shows changes in the mean tumor volume with passage of time after subcutaneous transplantation of the cancer cell lines.

The T/C values in the Nec8-4116-8 group and the Nec1-554-1 group were 39.2% and 38.7%, respectively, indicating that the antibodies both significantly inhibited the growth of MDA-MB-231 cell line-induced tumor ($p<0.0001$) (FIG. 4).

EXAMPLE 24

In vivo anti-tumor activity of anti-nectin-2 human monoclonal antibody (Nude mouse models for treating liver metastasis with OV-90 human ovarian cancer cell line)

The anti-tumor activities of the anti-nectin-2 human monoclonal antibody (Nec8-4116-8) prepared in REFERENCE EXAMPLE 36 were evaluated in nude mouse models for treating liver metastasis with the OV-90 human ovarian cancer cell line (purchased from ATCC). The Nec8-4116-8 antibody preparation used was the one prepared by the procedures described in REFERENCE EXAMPLE 38. The OV-90 cell line was seeded in a 150 cm^2 culture flask (Corning) charged with a medium, which was prepared by dissolving MCDB 105 Medium (Sigma) in 1L of distilled water, adjusting the pH to 7.5, aseptically filtrating, mixing 500 mL of this MCDB 105 Medium with 500 mL of Medium199 (Sigma) and adding 150 mL of FBS (Thermo Electron) thereto, followed by incubation at 37°C in a 5% carbon dioxide gas flow. The OV-90 cell suspension harvested at the logarithmic growth phase by detachment with trypsin-EDTA treatment was washed 3 times with Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen) by centrifugal operation (1,000 rpm, 3 minutes). The cells thus obtained were resuspended in HBSS at 1 x 10^7 cells/mL.

Nude mice (BALB/cAJcl-nu/nu) (5 weeks old, female), purchased from CLEA Japan, Inc., underwent laparotomy under ethereal anesthesia to expose the spleen. The OV-90 cell suspension described above was inoculated into the spleen at 100 μL each/animal. After the cell inoculation, the animal was intravenously injected via tail vein with the 3 mg/mL dilution of Nec8-4116-8 in PBS to reach 30 mg/kg every week on and after day 14 when engrafting into the liver was observed (on days 14, 21, 28, 35 and 42). For the control group, physiological saline was administered. One week after the final administration, 1 mL of 2.5% Evans Blue was administered via tail vein, the liver was taken out and immersed in 10% neutral buffered formalin solution for fixation. Then, the growth of the cancer cells metastasized in the liver was visually observed.

As a result, tumor growth in the liver was noted in 6 out of 6 cases in the control group, whereas in the Nec8-4116-8 group, tumor growth in the liver was noted only one out of 6 cases, indicating that Nec8-4116-8 markedly suppressed growth of the cancer cells engrafted into the liver.

CLAIMS

1. A monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

2. The antibody according to claim 1, which is a monoclonal antibody against a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

3. The antibody according to claim 1, which is a human monoclonal antibody.

4. The antibody according to claim 1, which is a chimeric monoclonal antibody.

5. The antibody according to claim 1, which is a humanized monoclonal antibody.

6. The antibody according to claim 1, which is a monoclonal antibody belonging to human IgG_1 subclass.

7. The antibody according to claim 1, which has a cancer cell growth inhibitory activity.

8. The antibody according to claim 1, which has antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

9. The antibody according to claim 1, which has a nectin-2/nectin-3 or nectin-2/nectin-2 trans-binding inhibitory activity.

10. The antibody according to claim 1, which is a monoclonal antibody capable of recognizing the epitope present in the 1st-350th amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3.

11. The antibody according to claim 1, which is a monoclonal antibody capable of recognizing the epitope present in the 47th-142nd or 175th-240th amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3.

12. The antibody according to claim 1, which is a monoclonal antibody capable of recognizing the amino acid sequence containing at least one amino acid residue of the 75th, 76th, 77th, 78th, 95th, 137th, 145th, 173rd, 184th, 186th and 212th amino acid residues in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3.

13. The antibody according to claim 1, wherein the antibody bind

competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1(FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1(FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), to the protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

14. The antibody according to claim 1, which is capable of recognizing the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence recognized by a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427) or Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

15. A hybridoma cell, which is capable of producing the antibody according to claim 1.

16. The hybridoma cell according to claim 15, which is represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

17. A monoclonal antibody produced by the hybridoma cell according to claim 16.

18. The antibody according to claim 1, which is a recombinant monoclonal antibody.

19. The antibody according to claim 1, wherein the amino acid sequences of a first complementarity determining region (CDR1), a second complementarity determining region (CDR2) and a third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially

the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively.

20. The antibody according to claim 1, wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) the sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively.

21. A diagnostic agent, which comprises a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

22. The diagnostic agent according to claim 21, which is a diagnostic agent for cancer.

23. A medicament, which comprises a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

24. The medicament according to claim 23, which is an agent for preventing/treating cancer.

25. The medicament according to claim 23, which is an apoptosis inducer of cancer cells.

26. The medicament according to claim 23, which is a growth inhibitor of cancer cells.

27. The medicament according to claim 23, which is a cytotoxic agent against cancer cells wherein a host defense mechanism mediated by the Fc region of

an antibody is utilized.

28. A method for preventing/treating cancer, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

29. A method for inducing apoptosis of cancer cells, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

30. A method for inhibiting growth of cancer cells, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

31. A method for killing cancer cells through a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody, which comprises administering to a mammal an effective dose of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof.

32. Use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of an agent for preventing/treating cancer.

33. Use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of an apoptosis inducer of cancer cells.

34. Use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of a growth inhibitor of cancer cells.

35. Use of a monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence

represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, in the manufacture of a cytotoxic agent against cancer cells through a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody.

36. An agent for preventing or treating breast cancer which comprises a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

37. An agent for preventing or treating breast cancer which comprises a monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) or Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

38. The agent for preventing or treating breast cancer according to claim 37, wherein the monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec1-554-1 (FERM BP-10681) is Nec1-1044-4 (FERM BP-10805) or Nec1-1302-2 (FERM BP-10684).

39. The agent for preventing or treating breast cancer according to claim 37, wherein the monoclonal antibody binding to nectin-2 competitively with a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell represented by Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) is Nec8-3704-7 (FERM BP-10807) or Nec8-3517-11 (FERM BP-10806).

40. The agent for preventing or treating breast cancer according to any one of claims 36 to 39, wherein a host defense mechanism mediated by the Fc region of the antibody is utilized.

41. An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable

region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively.

42. An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody, which are amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively.

43. An agent for preventing or treating breast cancer, which comprises an antibody wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a heavy chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (i) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 and 296, (ii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 and 297, and (iii) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 and 298, respectively; wherein the amino acid sequences of the first complementarity determining region (CDR1), the second complementarity determining region (CDR2) and the third complementarity determining region (CDR3) in a light chain variable region of said antibody comprise the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by (iv) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 and 304, (v) a

sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 and 305, and (vi) a sequence identification number selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 and 306, respectively; and, a constant region of said antibody.

44. A hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807).

45. A monoclonal antibody produced by the hybridoma cell according to claim 44.

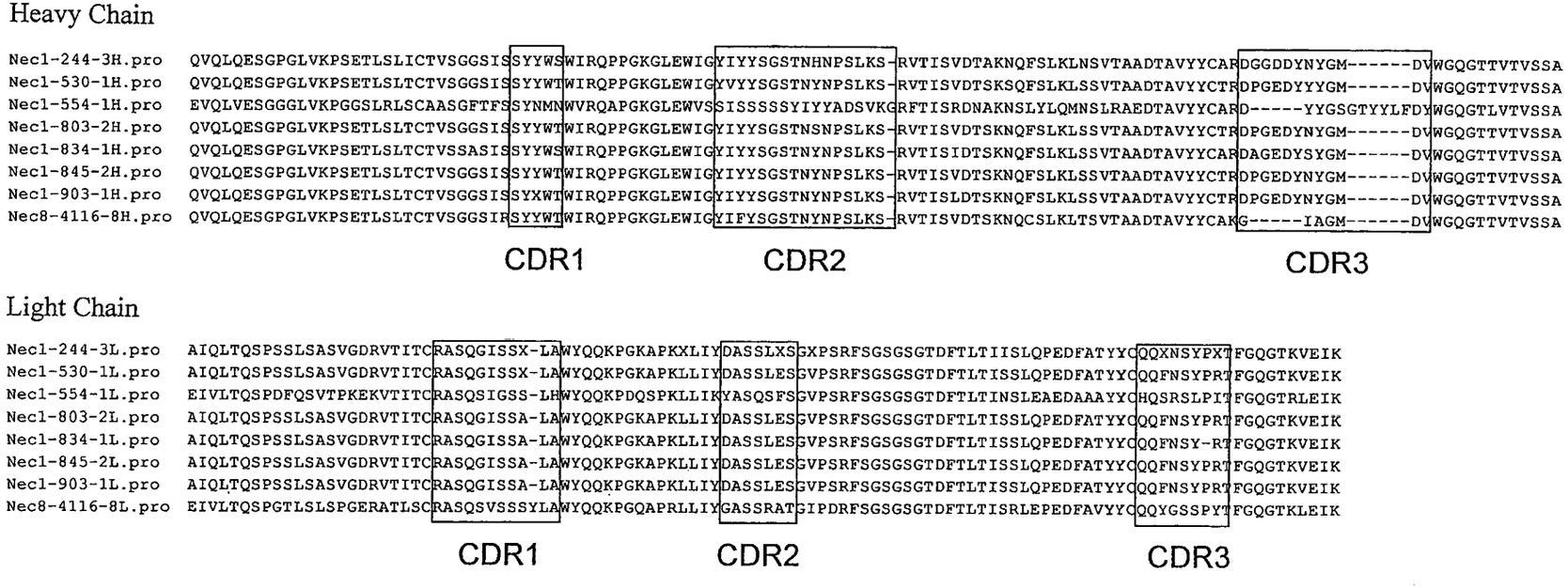
46. A monoclonal antibody binding competitively with a monoclonal antibody produced from the hybridoma cell represented by Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) or Nec8-3704-7 (FERM BP-10807).

47. An agent for preventing or treating breast cancer which comprises the monoclonal antibody according to claim 45 or 46.

ABSTRACT

A human monoclonal antibody against a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3, its partial peptide, or a salt thereof, is useful as an agent for preventing/treating cancer, etc., an apoptosis inducer of cancer cells, a growth inhibitor of cancer cells, a cytotoxic agent against cancer cells through a host defense mechanism mediated by the Fc region of an antibody, and so on.

FIG. 1


Heavy Chain
Nec1-244-3H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLICTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNHNPSLKS-RVTISVDTAKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARDGGDDYNYGM------DVWGQGTTVTVSSA
Nec1-530-1H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWTWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGSTNYNPSLKS-RVTISVDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRDPGEDYYYGM------DVWGQGTTVTVSSA
Nec1-554-1H.pro EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD-----YYGSGTYYLFDYWGQGTLVTVSSA
Nec1-803-2H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWTWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNSNPSLKS-RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRDPGEDYNYGM------DVWGQGTTVTVSSA
Nec1-834-1H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSSASISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKS-RVTISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDAGEDYSYGM------DVWGQGTTVTVSSA
Nec1-845-2H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWTWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKS-RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRDPGEDYNYGM------DVWGQGTTVTVSSA
Nec1-903-1H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYXWTWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKS-RVTISLDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRDPGEDYNYGM------DVWGQGTTVTVSSA
Nec8-4116-8H.pro QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWTWIRQPPGKGLEWIGYIFYSGSTNYNPSLKS-RVTISVDTSKNQCSLKLTSVTAADTAVYYCAKG-----IAGM------DVWGQGTTVTVSSA
CDR1
CDR2
CDR3
Light Chain
Nec1-244-3L.pro AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSX-LAWYQQKPGKAPKXLIYDASSLXSGXPSRFSGSGSGTDFTLTIISLQPEDFATYYCQQXNSYPXTFGQGTKVEIK
Nec1-530-1L.pro AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSX-LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPRTFGQGTKVEIK
Nec1-554-1L.pro EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSS-LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSRSLPITFGQGTRLEIK
Nec1-803-2L.pro AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA-LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPRTFGQGTKVEIK
Nec1-834-1L.pro AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA-LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSY-RTFGQGTKVEIK
Nec1-845-2L.pro AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA-LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPRTFGQGTKVEIK
Nec1-903-1L.pro AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA-LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPRTFGQGTKVEIK
Nec8-4116-8L.pro EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLEIK
CDR1
CDR2
CDR3

220

FIG.2

Heavy Chain

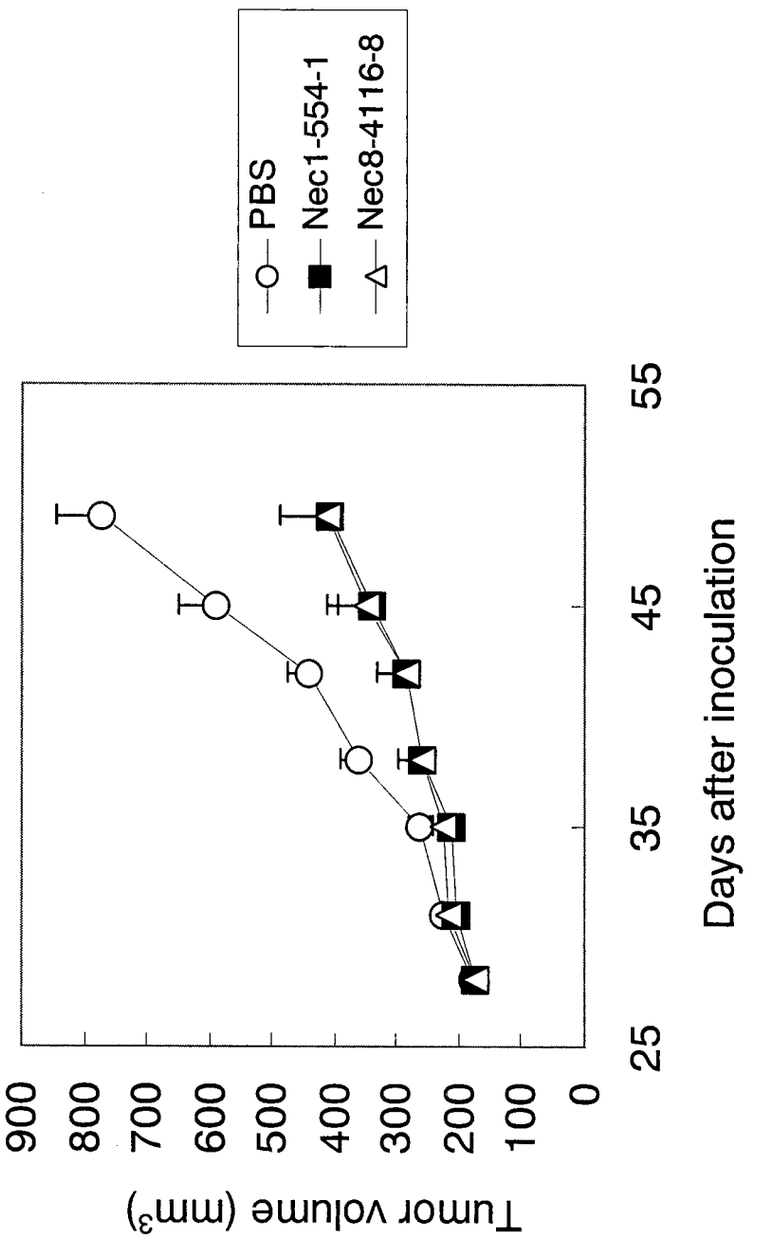


FIG.3

Light Chain



FIG.4


PBS
Nec1-554-1
Nec8-4116-8
Tumor volume (mm3)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
25
35
45
55
Days after inoculation

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Preventing and treating agent for cancer

<130> PCT07-0057

<150> PCT/JP2006/320429
<151> 2006-10-06
<150> JP2007-100876
<151> 2007-04-06

<160> 317

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 479
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
                5                  10                  15
Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
            20                  25                  30
Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
        35                  40                  45
Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
    50                  55                  60
Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
65                  70                  75                  80
Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
                85                  90                  95
Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
            100                 105                 110
Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
        115                 120                 125
Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
    130                 135                 140
Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145                 150                 155                 160
Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
                165                 170                 175
Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
            180                 185                 190
Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
    210                 215                 220
Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225                 230                 235                 240
Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
                245                 250                 255
Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
            260                 265                 270
```

```
Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
        275                 280                 285
Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
    290                 295                 300
Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305                 310                 315                 320
Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
                325                 330                 335
Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Arg Ala
            340                 345                 350
Ser Pro Arg Asp Val Gly Pro Leu Val Trp Gly Ala Val Gly Gly Thr
        355                 360                 365
Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Ile Leu
    370                 375                 380
Leu Arg Val Arg Arg Arg Arg Lys Ser Pro Gly Gly Ala Gly Gly Gly
385                 390                 395                 400
Ala Ser Gly Asp Gly Gly Phe Tyr Asp Pro Lys Ala Gln Val Leu Gly
                405                 410                 415
Asn Gly Asp Pro Val Phe Trp Thr Pro Val Val Pro Gly Pro Met Glu
            420                 425                 430
Pro Asp Gly Lys Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ala Glu
        435                 440                 445
Lys Gly Leu Met Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Glu Asp Asp Met Glu
    450                 455                 460
Ser Gln Leu Asp Gly Ser Leu Ile Ser Arg Arg Ala Val Tyr Val
465                 470                 475
```

<210> 2
<211> 1437
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg    60
ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc   120
gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt   180
cctggactgt acatctccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag   240
aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc   300
gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc   360
caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc   420
gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc   480
aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg   540
gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg   600
gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc   660
agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg   720
gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct   780
cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc   840
ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca   900
ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac   960
agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct  1020
gagcaggtca tctttgtccg agaaaccccc agggcctcgc cccgagatgt gggcccgctg  1080
gtgtgggggg ccgtgggggg gacactgctg gtgctgctgc ttctggctgg ggggtccttg  1140
gccttcatcc tgctgagggt gaggaggagg aggaagagcc ctggaggagc aggaggagga  1200
gccagtggcg acgggggatt ctacgatccg aaagctcagg tgttgggaaa tggggacccc  1260
gtcttctgga caccagtagt ccctggtccc atggaaccag atggcaagga tgaggaggag  1320
gaggaggagg aagagaaggc agagaaaggc ctcatgttgc ctccaccccc agcactcgag  1380
gatgacatgg agtcccagct ggacggctcc ctcatctcac ggcgggcagt ttatgtg      1437
```

<210> 3
<211> 538
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
405 410 415
Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
420 425 430
Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
435 440 445
Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
450 455 460
Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
465 470 475 480
Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp
485 490 495
Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile
500 505 510
Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys
515 520 525
Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
530 535

<210> 4
<211> 1614
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60
ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120
gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180
cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240
aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300
gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360
caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420
gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480
aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540
gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600
gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660
agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720
gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780
cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840
ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900
ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960
agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020
gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacaggcggc 1080
atcatcgggg gcatcatcgc cgccatcatt gctactgctg tggctgccac gggcatcctt 1140
atctgccggc agcagcggaa ggagcagacg ctgcaggggg cagaggagga cgaagacctg 1200
gagggacctc cctcctacaa gccaccgacc ccaaaagcga agctggaggc acaggagatg 1260
ccctcccagc tcttcactct gggggcctcg gagcacagcc cactcaagac cccctacttt 1320
gatgctggcg cctcatgcac tgagcaggaa atgcctcgat accatgagct gcccaccttg 1380
gaagaacggt caggaccctt gcaccctgga gccacaagcc tggggtcccc catcccggtg 1440
cctccagggc cacctgctgt ggaagacgtt tccctggatc tagaggatga ggagggggag 1500
gaggaggaag agtatctgga caagatcaac cccatctatg atgctctgtc ctatagcagc 1560
ccctctgatt cctaccaggg caaaggcttt gtcatgtccc gggccatgta tgtg 1614

<210> 5
<211> 549
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

```
        435                 440                 445
Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu Gln Gln Asp Glu Leu Asp
    450                 455                 460
Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn
465                 470                 475                 480
Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn
                485                 490                 495
Asn Val Glu Asn Leu Asn Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu
            500                 505                 510
Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu His Tyr Asp Glu
        515                 520                 525
Asn Glu Asp Asp Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg
    530                 535                 540
Arg Glu Trp Tyr Val
545
```

<210> 6
<211> 1647
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc    60
tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg   120
ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt   180
attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt   240
gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag   300
actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga   360
gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc   420
tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc   480
tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct   540
ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc   600
gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt   660
ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga   720
ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct   780
ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg   840
tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc   900
aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat   960
actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg  1020
accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact  1080
actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta  1140
gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac  1200
acaattgcca cgatcattgc tagtgtagtg ggtggggctc tcttcatagt acttgtaagt  1260
gttttggctg gaatattctg ctataggaga agacggacgt ttcgtggaga ctactttgcc  1320
aagaactaca ttccaccatc agatatgcaa aaagaatcac aaatagatgt tcttcaacaa  1380
gatgagcttg attcttaccc agacagtgta aaaaaagaaa acaaaaatcc agtgaacaat  1440
ctaatacgta aagactattt agaagagcct gaaaaaactc agtggaacaa tgtagaaaat  1500
ctcaataggt ttgaaagacc aatggattat tatgaagatc taaaaatggg aatgaagttt  1560
gtcagtgatg aacattatga tgaaaacgaa gatgacttag tttcacatgt agatggttcc  1620
gtaatttcca ggagggagtg gtatgtt                                      1647
```

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense oligonucleotide 1

<400> 7
tcccaacacc tgagctttcg 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Control oligonucleotide 1

<400> 8
gctttcgagt ccacaaccct 20

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 9
ggtcatcttt gtccgagaaa cc 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 10
tgagctttcg gatcgtagaa tc 22

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TaqMan Probe 1

<400> 11
ccgagatgtg ggcccgct 18

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 12
cccactcaag acccccтact tt 22

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 13
gctcatggta tcgaggcatt tc 22

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TaqMan Probe 2

<400> 14
atgctggcgc ctcatgcact gag 23

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 15
aattgaattc atggcccggg ccgct 25

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 16
aattgatatc tcacacataa actgcccgcc gt 32

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 17
gatatctcac acatacatgg cccgggaca 29

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 18
attgatatct cacacataca tggcccggga catg 34

<210> 19
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-1

<400> 19
acuacacuug cgaguuugc 19

<210> 20
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-1

<400> 20
gcaaacucgc aaguguagu 19

<210> 21
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-2

<400> 21
aaaguggagc augagagcu 19

<210> 22
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-2

<400> 22
agcucucaug cuccacuuu 19

<210> 23
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-3

<400> 23
ggucaucuuu guccgagaa 19

<210> 24
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-3

<400> 24
uucucggaca aagaugacc 19

<210> 25
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-4

<400> 25
gauucuacga uccgaaagc 19

<210> 26
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-4

<400> 26
gcuuucggau cguagaauc 19

<210> 27
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-5

<400> 27
ggaagagaag gcagagaaa 19

<210> 28
<211> 19

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA-5

<400> 28
uuucucugcc uucucuucc 19

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 29
aattgaattc atggcccggg ccgct 25

<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 30
aattctcgag ggcccctgcg cctgctgtgt 30

<210> 31
<211> 371
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	Arg	Ser	Pro	Pro	Thr	Pro
				5					10					15	
Leu	Leu	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Glu	Thr	Gly	Ala	Gln
			20					25					30		
Asp	Val	Arg	Val	Gln	Val	Leu	Pro	Glu	Val	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Gly
		35					40					45			
Thr	Val	Glu	Leu	Pro	Cys	His	Leu	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Gly	Leu	Tyr
	50					55					60				
Ile	Ser	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Arg	Pro	Asp	Ala	Pro	Ala	Asn	His	Gln
65					70					75					80
Asn	Val	Ala	Ala	Phe	His	Pro	Lys	Met	Gly	Pro	Ser	Phe	Pro	Ser	Pro
				85					90					95	
Lys	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Ala	Lys	Gln	Ser	Thr
			100					105					110		
Gly	Gln	Asp	Thr	Glu	Ala	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	His
		115					120					125			
Gly	Leu	Thr	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Glu	Phe	Ala	Thr
	130					135					140				
Phe	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Gly	Met	Thr	Trp	Leu	Arg	Val	Ile	Ala
145					150					155					160

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

<210> 32
<211> 1113
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32

```
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg    60
ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc   120
gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt   180
cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag   240
aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc   300
gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc   360
caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc   420
gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc   480
aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg   540
gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg   600
gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc   660
agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg   720
gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct   780
cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc   840
ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca   900
ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac   960
agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct  1020
gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacaggcggc  1080
atcctcgagg attacaagga tgacgacgat aag                               1113
```

<210> 33
<211> 30

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 33
aattgaattc cccaaatctt gtgacaaaac 30

<210> 34
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 34
aattctcgag tcatttaccc ggagacagg 29

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 35
aattaagctt atggcccggg ccgct 25

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 36
aattgaattc gggggtttct cgga 24

<210> 37
<211> 583
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15
Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
20 25 30
Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly

```
          35                  40                  45
Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
      50                  55                  60
Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
 65                  70                  75                  80
Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
                 85                  90                  95
Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
            100                 105                 110
Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
        115                 120                 125
Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
    130                 135                 140
Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145                 150                 155                 160
Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
                165                 170                 175
Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
            180                 185                 190
Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
    210                 215                 220
Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225                 230                 235                 240
Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
                245                 250                 255
Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
            260                 265                 270
Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
        275                 280                 285
Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
    290                 295                 300
Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305                 310                 315                 320
Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
                325                 330                 335
Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Glu Phe
            340                 345                 350
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        355                 360                 365
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    370                 375                 380
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
385                 390                 395                 400
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                405                 410                 415
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            420                 425                 430
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        435                 440                 445
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    450                 455                 460
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465                 470                 475                 480
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                485                 490                 495
```

```
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            500                 505                 510
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        515                 520                 525
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    530                 535                 540
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545                 550                 555                 560
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                565                 570                 575
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            580
```

<210> 38
<211> 1749
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38

```
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg    60
ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc   120
gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt   180
cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag   240
aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc   300
gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc   360
caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc   420
gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc   480
aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg   540
gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgccccgga tctcctggct ctcatccctg   600
gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc   660
agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg   720
gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct   780
cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc   840
ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca   900
ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac   960
agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct  1020
gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc gaattcccca aatcttgtga caaaactcac  1080
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc  1140
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg  1200
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg  1260
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc  1320
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc  1380
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga  1440
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc  1500
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat  1560
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc  1620
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca  1680
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct  1740
ccgggtaaa                                                          1749
```

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide 1 used in Example 16

<400> 39
Cys Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro Lys Pro Gly Ser Glu
5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide 2 used in Example 16

<400> 40
Arg Glu Thr Pro Arg Ala Ser Pro Arg Asp Val Gly Pro Leu Cys
5 10 15

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide 3 used in Example 16

<400> 41
Cys Thr Leu Gly Ala Ser Glu His Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr
5 10 15

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 42
gcccactcaa gacccctac 20

<210> 43
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 43
tcgaggcatt tcctgctca 19

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 44
ttgatgctgg cgcctcatgc a 21

<210> 45
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 45
aattgaattc cccagagggc ccacaatc 28

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 46
aattctcgag tcatttaccc ggagtcc 27

<210> 47
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 47
agttaagctt atggcgcgga ccctgcggc 29

<210> 48
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 48
attgaattcc gtggcaattg tgtcat 26

<210> 49
<211> 637

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

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

```
           420                 425                 430
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        435                 440                 445
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    450                 455                 460
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
465                 470                 475                 480
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                485                 490                 495
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            500                 505                 510
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        515                 520                 525
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    530                 535                 540
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
545                 550                 555                 560
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                565                 570                 575
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            580                 585                 590
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        595                 600                 605
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    610                 615                 620
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
625                 630                 635
```

<210> 50
<211> 1911
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 50

```
atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc    60
tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg   120
ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt   180
attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt   240
gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag   300
actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga   360
gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc   420
tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc   480
tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct   540
ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc   600
gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt   660
ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga   720
ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct   780
ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg   840
tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc   900
aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat   960
actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg  1020
accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact  1080
actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta  1140
gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac  1200
acaattgcca cggaattccc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccca  1260
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc  1320
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac  1380
```

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1440
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1500
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1560
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1620
ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1680
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1740
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1800
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1860
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1911

<210> 51
<211> 638
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Met Ala Arg Thr Leu Arg Pro Ser Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15
Ala Gln Leu Ser Ser Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Gln
20 25 30
Pro Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Leu Leu
35 40 45
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Pro Ile Ile Val Glu Pro
50 55 60
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95
Lys Ser Ser Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110
Val Gln Gly Glu Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140
Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
165 170 175
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Ile
180 185 190
Cys Ile Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala His Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Thr Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220
Ala Thr Ile Ile Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255
Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
275 280 285
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Phe Asn Tyr Ser Gly Val Tyr

```
                325                 330                 335
Ile Cys Lys Val Thr Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
            340                 345                 350
Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ile
        355                 360                 365
Gln Trp His Pro Ser Thr Ala Asp Ile Glu Asp Leu Ala Thr Glu Pro
    370                 375                 380
Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Lys Asp Asp
385                 390                 395                 400
Thr Ile Ala Thr Glu Phe Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
                405                 410                 415
Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
            420                 425                 430
Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val
    450                 455                 460
Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
465                 470                 475                 480
Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala
                485                 490                 495
Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
            500                 505                 510
Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
        515                 520                 525
Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
    530                 535                 540
Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
545                 550                 555                 560
Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
                565                 570                 575
Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
            580                 585                 590
Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
        595                 600                 605
Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
    610                 615                 620
Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
625                 630                 635
```

<210> 52
<211> 1914
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 52

```
atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc    60
tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg   120
ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt   180
attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt   240
gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag   300
actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga   360
gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc   420
tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc   480
tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct   540
ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc   600
gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt   660
```

ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga 720
ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct 780
ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg 840
tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc 900
aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat 960
actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg 1020
accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact 1080
actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta 1140
gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac 1200
acaattgcca cggaattccc cagagggccc acaatcaagc cctgtcctcc atgcaaatgc 1260
ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat 1320
gtactcatga tctccctgag ccccatagtc acatgtgtgg tggtggatgt gagcgaggat 1380
gacccagatg tccagatcag ctggtttgtg aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca 1440
caaacccata gagaggatta caacagtact ctccgggtgg tcagtgccct ccccatccag 1500
caccaggact ggatgagtgg caaggagttc aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca 1560
gcgcccatcg agagaaccat ctcaaaaccc aaagggtcag taagagctcc acaggtatat 1620
gtcttgcctc caccagaaga agagatgact aagaaacagg tcactctgac ctgcatggtc 1680
acagacttca tgcctgaaga catttacgtg gagtggacca acaacgggaa aacagagcta 1740
aactacaaga acactgaacc agtcctggac tctgatggtt cttacttcat gtacagcaag 1800
ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa agaaatagct actcctgttc agtggtccac 1860
gagggtctgc acaatcacca cacgactaag agcttctccc ggactccggg taaa 1914

<210> 53
<211> 102
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding flag protein

<400> 53
ctagtctcga gaattcacgc gtggtacctc tagagtcgac atggactaca aggacgacga 60

tgacaaggct agcgactaca aggacgacga tgacaagtga gc 102

<210> 54
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding flag protein

<400> 54
ggccgctcac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgctagcc ttgtcatcgt cgtccttgta 60

gtccatgtcg actctagagg taccacgcgt aattctcgag a 101

<210> 55
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 55
acgcgtcgac caccatggcg cggaccctgc ggcc 34

<210> 56
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 56
ctagctagcc gtggcaattg tgtcatcct 29

<210> 57
<211> 414
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Nectin-3ED-FLAG protein

<400> 57

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

Ala Gln Leu Ser Ser Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Gln
20 25 30

Pro Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Leu Leu
35 40 45

Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Pro Ile Ile Val Glu Pro
50 55 60

His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80

Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95

Lys Ser Ser Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110

Val Gln Gly Glu Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu

115 120 125

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140

Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160

Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
165 170 175

Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Ile
180 185 190

Cys Ile Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala His Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205

Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Thr Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220

Ala Thr Ile Ile Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240

Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
275 280 285

Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300

Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320

Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Phe Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 330 335

Ile Cys Lys Val Thr Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
340 345 350

Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ile
355 360 365

Gln Trp His Pro Ser Thr Ala Asp Ile Glu Asp Leu Ala Thr Glu Pro
370 375 380

Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Lys Asp Asp
385 390 395 400

Thr Ile Ala Thr Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
405 410

<210> 58
<211> 1242
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding Nectin-3ED-FLAG protein

<400> 58
atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc 60

tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg 120

ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt 180

attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt 240

gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag 300

actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga 360

gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc 420

tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc 480

tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct 540

ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc 600

gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt 660

ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga 720

ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct 780

ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg 840

tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc 900

aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat 960

actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg 1020

accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact 1080

actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta 1140

gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac 1200

acaattgcca cggctagcga ctacaaggac gacgatgaca ag 1242

<210> 59
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 59
aattgatatc atggctcgga tggggctt 28

<210> 60
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 60
aattctcgag cacgtaccac tccttctt 28

<210> 61
<211> 1551
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 61
atggctcgga tggggcttgc gggcgccgct ggacgctggt ggggactcgc tctcggcttg 60

accgcattct tcctcccagg cgtccactcc caggtggtcc aggtgaacga ctccatgtat 120

ggcttcatcg gcacagacgt ggttctgcac tgcagctttg ccaacccgct tcccagcgtg 180

aagatcaccc aggtcacatg gcagaagtcc accaatggct ccaagcagaa cgtggccatc 240

tacaacccat ccatgggcgt gtccgtgctg gctccctacc gcgagcgtgt ggaattcctg 300

cggccctcct tcaccgatgg cactatccgc ctctcccgcc tggagctgga ggatgagggt 360

gtctacatct gcgagtttgc taccttccct acgggcaatc gagaaagcca gctcaatctc 420

acggtgatgg ccaaacccac caattggata gagggtaccc aggcagtgct tcgagccaag 480

aaggggcagg atgacaaggt cctggtggcc acctgcacct cagccaatgg gaagcctccc 540

agtgtggtat cctgggaaac tcggttaaaa ggtgaggcag agtaccagga gatccggaac 600

cccaatggca cagtgacggt catcagccgc taccgcctgg tgcccagcag ggaagcccac 660

cagcagtcct tggcctgcat cgtcaactac cacatggacc gcttcaagga aagcctcact 720

ctcaacgtgc agtatgagcc tgaggtaacc attgaggggt ttgatggcaa ctggtacctg 780

cagcggatgg acgtgaagct cacctgcaaa gctgatgcta acccccccagc cactgagtac 840

cactggacca cgctaaatgg ctctctcccc aagggtgtgg aggcccagaa cagaaccctc 900

ttcttcaagg gacccatcaa ctacagcctg gcagggacct acatctgtga ggccaccaac 960

cccatcggta cacgctcagg ccaggtggag gtcaatatca cagaattccc ctacaccccg 1020

tctcctcccg aacatgggcg gcgcgccggg ccggtgccca cggccatcat tgggggcgtg 1080

gcggggagca tcctgctggt gttgattgtg gtcggcggga tcgtggtcgc cctgcgtcgg 1140

cgccggcaca ccttcaaggg tgactacagc accaagaagc acgtgtatgg caacggctac 1200

agcaaggcag gcatccccca gcaccaccca ccaatggcac agaacctgca gtaccccgac 1260

gactcagacg acgagaagaa ggccggccca ctgggtggaa gcagctatga ggaggaggag 1320

gaggaggagg agggcggtgg agggggcgag cgcaaggtgg gcggccccca ccccaaatat 1380

gacgaggacg ccaagcggcc ctacttcacc gtggatgagg ccgaggcccg tcaggacggc 1440

tacggggacc ggactctggg ctaccagtac gaccctgagc agctggactt ggctgagaac 1500

atggtttctc agaacgacgg gtctttcatt tccaagaagg agtggtacgt g 1551

<210> 62
<211> 517
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Val His Ser Gln Val
20 25 30

Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
35 40 45

```
Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Ser Val Lys Ile Thr Gln
    50                  55                  60

Val Thr Trp Gln Lys Ser Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Pro Ser Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
                85                  90                  95

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

Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
        115                 120                 125

Phe Pro Thr Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Ala
    130                 135                 140

Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Ala Lys
145                 150                 155                 160

Lys Gly Gln Asp Asp Lys Val Leu Val Ala Thr Cys Thr Ser Ala Asn
                165                 170                 175

Gly Lys Pro Pro Ser Val Val Ser Trp Glu Thr Arg Leu Lys Gly Glu
            180                 185                 190

Ala Glu Tyr Gln Glu Ile Arg Asn Pro Asn Gly Thr Val Thr Val Ile
        195                 200                 205

Ser Arg Tyr Arg Leu Val Pro Ser Arg Glu Ala His Gln Gln Ser Leu
    210                 215                 220

Ala Cys Ile Val Asn Tyr His Met Asp Arg Phe Lys Glu Ser Leu Thr
225                 230                 235                 240

Leu Asn Val Gln Tyr Glu Pro Glu Val Thr Ile Glu Gly Phe Asp Gly
                245                 250                 255

Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Met Asp Val Lys Leu Thr Cys Lys Ala Asp
            260                 265                 270
```

Ala Asn Pro Pro Ala Thr Glu Tyr His Trp Thr Thr Leu Asn Gly Ser
275 280 285

Leu Pro Lys Gly Val Glu Ala Gln Asn Arg Thr Leu Phe Phe Lys Gly
290 295 300

Pro Ile Asn Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ala Thr Asn
305 310 315 320

Pro Ile Gly Thr Arg Ser Gly Gln Val Glu Val Asn Ile Thr Glu Phe
325 330 335

Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Glu His Gly Arg Arg Ala Gly Pro Val
340 345 350

Pro Thr Ala Ile Ile Gly Gly Val Ala Gly Ser Ile Leu Leu Val Leu
355 360 365

Ile Val Val Gly Gly Ile Val Val Ala Leu Arg Arg Arg Arg His Thr
370 375 380

Phe Lys Gly Asp Tyr Ser Thr Lys Lys His Val Tyr Gly Asn Gly Tyr
385 390 395 400

Ser Lys Ala Gly Ile Pro Gln His His Pro Pro Met Ala Gln Asn Leu
405 410 415

Gln Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Asp Glu Lys Lys Ala Gly Pro Leu Gly
420 425 430

Gly Ser Ser Tyr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Glu Arg Lys Val Gly Gly Pro His Pro Lys Tyr Asp Glu Asp Ala
450 455 460

Lys Arg Pro Tyr Phe Thr Val Asp Glu Ala Glu Ala Arg Gln Asp Gly
465 470 475 480

Tyr Gly Asp Arg Thr Leu Gly Tyr Gln Tyr Asp Pro Glu Gln Leu Asp
485 490 495

Leu Ala Glu Asn Met Val Ser Gln Asn Asp Gly Ser Phe Ile Ser Lys

500 505 510

Lys Glu Trp Tyr Val
515

<210> 63
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 63
atcgatatct caaacatacc actccctcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 64
aattctcgag aacataccac tccctcctg 29

<210> 65
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 65
aattgaattc atgcccctgt ccctg 25

<210> 66
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 66
ttaactcgag gaccaggtgt ccccgccca 29

<210> 67
<211> 1530

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 67

atgcccctgt ccctgggagc cgagatgtgg gggcctgagg cctggctgct gctgctgcta 60

ctgctggcat catttacagg ccggtgcccc gcgggtgagc tggagacctc agacgtggta 120

actgtggtgc tgggccagga cgcaaaactg ccctgcttct accgagggga ctccggcgag 180

caagtggggc aagtggcatg ggctcgggtg gacgcgggcg aaggcgccca ggaactagcg 240

ctactgcact ccaaatacgg gcttcatgtg agcccggctt acgagggccg cgtggagcag 300

ccgccgcccc cacgcaaccc cctggacggc tcagtgctcc tgcgcaacgc agtgcaggcg 360

gatgagggcg agtacgagtg ccgggtcagc accttccccg ccggcagctt ccaggcgcgg 420

ctgcggctcc gagtgctggt gcctcccctg ccctcactga atcctggtcc agcactagaa 480

gagggccagg gcctgaccct ggcagcctcc tgcacagctg agggcagccc agcccccagc 540

gtgacctggg acacggaggt caaaggcaca acgtccagcc gttccttcaa gcactcccgc 600

tctgctgccg tcacctcaga gttccacttg gtgcctagcc gcagcatgaa tgggcagcca 660

ctgacttgtg tggtgtccca tcctggcctg ctccaggacc aaaggatcac ccacatcctc 720

cacgtgtcct tccttgctga ggcctctgtg aggggccttg aagaccaaaa tctgtggcac 780

attggcagag aaggagctat gctcaagtgc ctgagtgaag ggcagccccc tccctcatac 840

aactggacac ggctggatgg gcctctgccc agtggggtac gagtggatgg ggacactttg 900

ggctttcccc cactgaccac tgagcacagc ggcatctacg tctgccatgt cagcaatgag 960

ttctcctcaa gggattctca ggtcactgtg gatgttcttg acccccagga agactctggg 1020

aagcaggtgg acctagtgtc agcctcggtg gtggtggtgg gtgtgatcgc cgcactcttg 1080

ttctgccttc tggtggtggt ggtggtgctc atgtcccgat accatcggcg caaggcccag 1140

cagatgaccc agaaatatga ggaggagctg accctgacca gggagaactc catccggagg 1200

ctgcattccc atcacacgga ccccaggagc cagccggagg agagtgtagg gctgagagcc 1260

gagggccacc ctgatagtct caaggacaac agtagctgct ctgtgatgag tgaagagccc 1320

gagggccgca gttactccac gctgaccacg gtgagggaga tagaaacaca gactgaactg 1380

ctgtctccag gctctgggcg ggccgaggag gaggaagatc aggatgaagg catcaaacag 1440

gccatgaacc attttgttca ggagaatggg accctacggg ccaagcccac gggcaatggc 1500

atctacatca atgggcgggg acacctggtc 1530

<210> 68
<211> 510
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

```
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly
            20                  25                  30

Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala
        35                  40                  45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln
    50                  55                  60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala
65                  70                  75                  80

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

Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val
            100                 105                 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg
        115                 120                 125

Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg
    130                 135                 140

Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser
                165                 170                 175

Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr Thr Ser
            180                 185                 190

Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser Glu Phe
        195                 200                 205
```

His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr Cys Val
210 215 220

Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His Ile Leu
225 230 235 240

His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu Asp Gln
245 250 255

Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys Leu Ser
260 265 270

Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp Gly Pro
275 280 285

Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp Thr Leu Gly Phe Pro Pro
290 295 300

Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser Asn Glu
305 310 315 320

Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp Pro Gln
325 330 335

Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Val
340 345 350

Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val
355 360 365

Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys Ala Gln Gln Met Thr Gln
370 375 380

Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg Glu Asn Ser Ile Arg Arg
385 390 395 400

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

Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser Leu Lys Asp Asn Ser Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Thr Leu
435 440 445

Thr Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr Glu Leu Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln Asp Glu Gly Ile Lys Gln
465 470 475 480

Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly Thr Leu Arg Ala Lys Pro
485 490 495

Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Gly His Leu Val
500 505 510

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 69
aattaagctt atggcccgag ccatg 25

<210> 70
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 70
aattgtcgac ccttgtgccc tctgt 25

<210> 71
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln

```
            20                  25                  30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
        35                  40                  45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
    50                  55                  60

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
                85                  90                  95

Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
            100                 105                 110

Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
        115                 120                 125

Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
    130                 135                 140

Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
145                 150                 155                 160

Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
                165                 170                 175

Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
            180                 185                 190

Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
        195                 200                 205

Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
    210                 215                 220

His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
                245                 250                 255
```

Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
260 265 270

Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
275 280 285

Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
305 310 315 320

Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
325 330 335

His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
340 345 350

Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser
355 360 365

Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
370 375 380

Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala
385 390 395 400

Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr
405 410 415

Arg

<210> 72
<211> 1251
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 72
atggcccgag ccatggccgc cgcgtggccg ctgctgctgg tggcgctact ggtgctgtcc 60

tggccacccc caggaaccgg ggacgtcgtc gtgcaggcgc ccacccaggt gcccggcttc 120

ttgggcgact ccgtgacgct gccctgctac ctacaggtgc ccaacatgga ggtgacgcat 180

gtgtcacagc tgacttgggc gcggcatggt gaatctggca gcatggccgt cttccaccaa 240

acgcagggcc ccagctattc ggagtccaaa cggctggaat tcgtggcagc cagactgggc 300

gcggagctgc ggaatgcctc gctgaggatg ttcgggttgc gcgtagagga tgaaggcaac 360

tacacctgcc tgttcgtcac gttcccgcag ggcagcagga gcgtggatat ctggctccga 420

gtgcttgcca agccccagaa cacagctgag gttcagaagg tccagctcac tggagagcca 480

gtgcccatgg cccgctgcgt ctccacaggg ggtcgcccgc cagcccaaat cacctggcac 540

tcagacctgg gcgggatgcc caatacgagc caggtgccag ggttcctgtc tggcacagtc 600

actgtcacca gcctctggat attggtgccc tcaagccagg tggacggcaa gaatgtgacc 660

tgcaaggtgg agcacgagag ctttgagaag cctcagctgc tgactgtgaa cctcaccgtg 720

tactaccccc cagaggtatc catctctggc tatgataaca actggtacct tggccagaat 780

gaggccaccc tgacctgcga tgctcgcagc aacccagagc ccacaggcta taattggagc 840

acgaccatgg gtcccctgcc acccttgct gtggcccagg gcgcccagct cctgatccgt 900

cctgtggaca aaccaatcaa cacaacttta atctgcaacg tcaccaatgc cctaggagct 960

cgccaggcag aactgaccgt ccaggtcaaa gagggacctc ccagtgagca ctcaggcatg 1020

tcccgtaacg ccatcatctt cctggttctg ggaatcctgg tttttctgat cctgctgggg 1080

atcgggattt atttctattg gtccaaatgt tcccgtgagg tcctttggca ctgtcatctg 1140

tgtccctcga gtacagagca tgccagcgcc tcagctaatg ggcatgtctc ctattcagct 1200

gtgagcagag agaacagctc ttcccaggat ccacagacag agggcacaag g 1251

<210> 73
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 73
aattgatatc agcgcccccg ag 22

<210> 74
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 74
aattgatatc agggaacgtg accttct 27

<210> 75
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 75
aattgatatc cagaaggtca cgttcag 27

<210> 76
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 76
aattcctcga gtcacacata catggc 26

<210> 77
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 77
aattgatatc tccatctccg gctatga 27

<210> 78
<211> 421
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Protein

<400> 78

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
20 25 30

```
Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
        35                  40                  45

Ala Asp Ile Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp Pro Thr Thr Val Ala
    50                  55                  60

Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala Arg Ile Ser Trp Leu
65                  70                  75                  80

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

Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr Leu Val Pro Ser Gly
            100                 105                 110

Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe
        115                 120                 125

Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser Val Arg Tyr Pro Pro
    130                 135                 140

Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp Tyr Leu Gly Arg Thr
145                 150                 155                 160

Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly
                165                 170                 175

Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro Thr Ser Ala Val Ala
            180                 185                 190

Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp Ser Leu Phe Asn Thr
        195                 200                 205

Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly Met Gly Arg Ala Glu
    210                 215                 220

Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr Ala Gly Ala Gly Ala
225                 230                 235                 240

Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala Ile Ile Ala Thr Ala
                245                 250                 255
```

Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln Gln Arg Lys Glu Gln
260 265 270

Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu Glu Gly Pro Pro Ser
275 280 285

Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu Ala Gln Glu Met Pro
290 295 300

Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His Ser Pro Leu Lys Thr
305 310 315 320

Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu Gln Glu Met Pro Arg
325 330 335

Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser Gly Pro Leu His Pro
340 345 350

Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val Pro Pro Gly Pro Pro
355 360 365

Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu
370 375 380

Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile Tyr Asp Ala Leu Ser
385 390 395 400

Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys Gly Phe Val Met Ser
405 410 415

Arg Ala Met Tyr Val
420

<210> 79
<211> 1263
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 79
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcgctgat atccagaagg tcacgttcag ccaggaccct 180

acgacagtgg ccctctgcat ctccaaagag ggccgcccac ctgcccggat ctcctggctc 240

tcatccctgg actgggaagc caaagagact caggtgtcag ggaccctggc cggaactgtc 300

actgtcacca gccgcttcac cttggtgccc tcgggccgag cagatggtgt cacggtcacc 360

tgcaaagtgg agcatgagag cttcgaggaa ccagccctga tacctgtgac cctctctgta 420

cgctaccctc ctgaagtgtc catctccggc tatgatgaca actggtacct cggccgtact 480

gatgccaccc tgagctgtga cgtccgcagc aacccagagc ccacgggcta tgactggagc 540

acgacctcag gcaccttccc gacctccgca gtggcccagg gctcccagct ggtcatccac 600

gcagtggaca gtctgttcaa taccaccttc gtctgcacag tcaccaatgc cgtgggcatg 660

ggccgcgctg agcaggtcat ctttgtccga gagaccccca acacagcagg cgcaggggcc 720

acaggcggca tcatcggggg catcatcgcc gccatcattg ctactgctgt ggctgccacg 780

ggcatcctta tctgccggca gcagcggaag gagcagacgc tgcagggggc agaggaggac 840

gaagacctgg agggacctcc ctcctacaag ccaccgaccc caaaagcgaa gctggaggca 900

caggagatgc cctcccagct cttcactctg ggggcctcgg agcacagccc actcaagacc 960

ccctactttg atgctggcgc ctcatgcact gagcaggaaa tgcctcgata ccatgagctg 1020

cccaccttgg aagaacggtc aggacccttg caccctggag ccacaagcct ggggtccccc 1080

atcccggtgc ctccagggcc acctgctgtg gaagacgttt ccctggatct agaggatgag 1140

gagggggagg aggaggaaga gtatctggac aagatcaacc ccatctatga tgctctgtcc 1200

tatagcagcc cctctgattc ctaccagggc aaaggctttg tcatgtcccg ggccatgtat 1260

gtg 1263

<210> 80
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Protein

<400> 80

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln

20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
85 90 95

Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
100 105 110

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Pro Asp Ile
165 170 175

Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala
180 185 190

Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp
195 200 205

Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly
210 215 220

Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe
225 230 235 240

Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly Met Gly Arg Ala Glu Gln Val
245 250 255

```
Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly
            260                 265                 270

Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala
        275                 280                 285

Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu
    290                 295                 300

Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln
                325                 330                 335

Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr
            340                 345                 350

Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu Gln Glu Met Pro Arg Tyr His
        355                 360                 365

Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser Gly Pro Leu His Pro Gly Ala
    370                 375                 380

Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val
385                 390                 395                 400

Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu
                405                 410                 415

Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser
            420                 425                 430

Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys Gly Phe Val Met Ser Arg Ala
        435                 440                 445

Met Tyr Val
    450
```

<210> 81
<211> 1353
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 81
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300

gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttcc ctgatatctc catctccggc 540

tatgatgaca actggtacct cggccgtact gatgccaccc tgagctgtga cgtccgcagc 600

aacccagagc ccacgggcta tgactggagc acgacctcag gcaccttccc gacctccgca 660

gtggcccagg gctcccagct ggtcatccac gcagtggaca gtctgttcaa taccaccttc 720

gtctgcacag tcaccaatgc cgtgggcatg ggccgcgctg agcaggtcat ctttgtccga 780

gagaccccca acacagcagg cgcaggggcc acaggcggca tcatcggggg catcatcgcc 840

gccatcattg ctactgctgt ggctgccacg ggcatcctta tctgccggca gcagcggaag 900

gagcagacgc tgcagggggc agaggaggac gaagacctgg agggacctcc ctcctacaag 960

ccaccgaccc caaaagcgaa gctggaggca caggagatgc cctcccagct cttcactctg 1020

ggggcctcgg agcacagccc actcaagacc ccctactttg atgctggcgc ctcatgcact 1080

gagcaggaaa tgcctcgata ccatgagctg cccaccttgg aagaacggtc aggacccttg 1140

caccctggag ccacaagcct ggggtccccc atcccggtgc ctccagggcc acctgctgtg 1200

gaagacgttt ccctggatct agaggatgag gaggggggagg aggaggaaga gtatctggac 1260

aagatcaacc ccatctatga tgctctgtcc tatagcagcc cctctgattc ctaccagggc 1320

aaaggctttg tcatgtcccg ggccatgtat gtg 1353

<210> 82
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 82
agctgggccg ggagagcaga aca 23

<210> 83
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 83
aaatgggatg cacgtgtgtt aactgac 27

<210> 84
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 84
agagcagaac agggaggcta gag 23

<210> 85
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 85
caagaaagct aagggatcaa caggtgag 28

<210> 86
<211> 538
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 86

Met Ala Arg Ala Val Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Lys Thr Gly Ala Gln
20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Pro Asp His Gln
65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
85 90 95

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

Arg Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu Arg
115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160

Lys Pro Gln Asn His Ala Glu Ala Gln Glu Val Thr Phe Ser Gln Asp
165 170 175

Pro Val Pro Val Ala Arg Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
195 200 205

Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225 230 235 240

Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
245 250 255

Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
260 265 270

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val His Ser Asn
275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Ile Phe Pro
290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
340 345 350

Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala
355 360 365

Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
370 375 380

Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
385 390 395 400

Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
405 410 415

Glu Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
420 425 430

Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
435 440 445

Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
450 455 460

Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
465 470 475 480

Pro Pro Gly Pro Pro Val Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp
485 490 495

Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Val
500 505 510

Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys
515 520 525

Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
530 535

<210> 87
<211> 1614
<212> DNA
<213> Macaca fascicularis

<400> 87
atggcccggg ccgttgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctccg gaaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtactaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatctccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctcc agaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcccggcagc 300

cagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactaggc aagacacaga ggcggagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccgcgggctc acggtggagg acgaaggcaa ctacacctgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtcggtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagccccaga accacgctga ggcccaggag gtcacgttca gccaggaccc tgtgccagtg 540

gcccgctgca tctccaaaga gggtcgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac ccaggtatca gggaccctgg ccggcactgt caccgtcacc 660

agccgcttca ccttggtccc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga gccagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccacag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcatcttcc caacctccgc agtagcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcggtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacgggcggc 1080

atcatcgggg gcatcatcgc cgccatcatt gcgactgctg tggctgccac gggcatcctt 1140

atctgccggc agcagcggaa ggagcagacg ctgcaggggg cagaggagga tgaagaccta 1200

gagggacctc cctcctacaa gccaccgacc ccaaaagcga agctggagga gcaggagatg 1260

ccctcccagc tcttcactct gggggcctcg gagcacagcc cactcaagac cccctacttt 1320

gacgctggcg cctcatgcac tgagcaggaa atgcctcgat accatgaatt gcccactttg 1380

gaagagcggt caggaccccc gcaccctgga gccacaagcc tgggatcccc catcccggtg 1440

cctccagggc cacctgttgt ggaagacgtt tccctggatc tagaggatga ggagggggag 1500

gaggaggaag agtatctgga taagatcaac cccgtctacg atgctctgtc ctacagcagc 1560

ccctctgatt cctaccaggg caaaggcttt gtcatgtccc gggccatgta cgtg 1614

<210> 88
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 88
aattgaattc atggcccggg ccgtt 25

<210> 89
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 89
aattctcgag tcacacgtac atggcccggg a 31

<210> 90
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 90
agaagcttgc caccatggcc cgggccgctg ccctcc 36

<210> 91

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 91
cattctggtg gtctggaggt gcatc 25

<210> 92
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 92
gagaattctc acacatacat ggcccgggac atg 33

<210> 93
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 93
gatgcacctc cagaccacca gaatg 25

<210> 94
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 94
ctgtgtcttg cctagtgctc tg 22

<210> 95
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 95
cagagcacta ggcaagacac ag 22

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 96
cgtgagcccg cggagggcca g 21

<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 97
ctggccctcc gcgggctcac g 21

<210> 98
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 98
ggatgtgcga gttgcagtgc tacccgag 28

<210> 99
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 99
ctcgggtagc actgcaactc gcacatcc 28

<210> 100
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 100
gagttcaagt gctaggcgag gtgcgaggcc 30

<210> 101
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 101
ggcctcgcac ctcgcctagc acttgaactc 30

<210> 102
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 102
ccgaggtgcg aggcgcgctc gggggcaccg 30

<210> 103
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 103
cggtgccccc gagcgcgcct cgcacctcgg 30

<210> 104
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 104
tggagctgcc gtgcgccctg ctgccacctg 30

<210> 105
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 105
caggtggcag cagggcgcac ggcagctcca 30

<210> 106
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 106
ctgctgccac ctgctcctgg actgtac 27

<210> 107
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 107
gtacagtcca ggagcaggtg gcagcag 27

<210> 108
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 108
ctgttcctgg actggccatc tccctggtga 30

<210> 109
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 109
tcaccaggga gatggccagt ccaggaacag 30

<210> 110

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 110
cctggtgacc tgggcgcgcc cagatgcac 29

<210> 111
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 111
gtgcatctgg gcgcgcccag gtcaccagg 29

<210> 112
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 112
gcagcgccca gatggacctg cgaaccacc 29

<210> 113
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 113
ggtggttcgc aggtccatct gggcgctgc 29

<210> 114
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 114
gcgcccagat gcaggtgcga accaccag 28

<210> 115
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 115
ctggtggttc gcacctgcat ctgggcgc 28

<210> 116
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 116
gcccagatgc acctgggaac caccagaatg 30

<210> 117
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 117
cattctggtg gttcccaggt gcatctgggc 30

<210> 118
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 118
cagatgcacc tgcggcccac cagaatgtgg 30

<210> 119
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 119
ccacattctg gtgggccgca ggtgcatctg 30

<210> 120
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 120
atgcacctgc gaacgcccag aatgtggccg 30

<210> 121
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 121
cggccacatt ctgggcgttc gcaggtgcat 30

<210> 122
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 122
cctgcgaacc acgcgaatgt ggccgc 26

<210> 123
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 123
gcggccacat tcgcgtggtt cgcagg 26

<210> 124
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 124
ctgcgaacca ccaggctgtg gccgccttcc 30

<210> 125
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 125
ggaaggcggc cacagcctgg tggttcgcag 30

<210> 126
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 126
ccgccttcca ccctgcgatg ggtcccagct 30

<210> 127
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 127
agctgggacc catcgcaggg tggaaggcgg 30

<210> 128
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 128
gtcccagctt ccccgccccg aagcctggca 30

<210> 129

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 129
tgccaggctt cggggcgggg aagctgggac 30

<210> 130
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 130
ccttcgtctc tgccgcgcag agcactgggc 30

<210> 131
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 131
gcccagtgct ctgcgcggca gagacgaagg 30

<210> 132
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 132
tgggcaagac acagcggcag agctccagg 29

<210> 133
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 133
cctggagctc tgccgctgtg tcttgccca 29

<210> 134
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 134
ggcagagctc caggccgcca cgctggccc 29

<210> 135
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 135
gggccagcgt ggcggcctgg agctctgcc 29

<210> 136
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 136
ccacgctggc cctcgccggg ctcacggtgg 30

<210> 137
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 137
ccaccgtgag cccggcgagg gccagcgtgg 30

<210> 138
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 138
ggaggacgag ggcgcctaca cttgcgag 28

<210> 139
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 139
ctcgcaagtg taggcgccct cgtcctcc 28

<210> 140
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 140
gcgagtttgc caccgccccc aaggggtccg 30

<210> 141
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 141
cggacccctt gggggcggtg gcaaactcgc 30

<210> 142
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 142
ttgccacctt ccccgcgggg tccgtccgag 30

<210> 143
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 143
ctcggacgga ccccgcgggg aaggtggcaa 30

<210> 144
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 144
cccaaggggt ccgcccgagg gatgacc 27

<210> 145
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 145
ggtcatccct cgggcggacc ccttggg 27

<210> 146
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 146
ggtccgtccg aggggcgacc tggctcagag 30

<210> 147
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 147
ctctgagcca ggtcgcccct cggacggacc 30

<210> 148

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 148
ccgtccgagg gatggcctgg ctcagagtc 29

<210> 149
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 149
gactctgagc caggccatcc ctcggacgg 29

<210> 150
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 150
ccaagcccaa gaacgcagct gaggcccaga 30

<210> 151
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 151
tctgggcctc agctgcgttc ttgggcttgg 30

<210> 152
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 152
aagctgaggc ccaggcggtc acgttcagcc 30

<210> 153
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 153
ggctgaacgt gaccgcctgg gcctcagctt 30

<210> 154
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 154
cccagaaggt cacggccagc caggacccta 30

<210> 155
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 155
tagggtcctg gctggccgtg accttctggg 30

<210> 156
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 156
cgttcagcca ggacggtacg acagtggccc 30

<210> 157
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 157
gggccactgt cgtaccgtcc tggctgaacg 30

<210> 158
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 158
cagtggccct ctgcgcctcc aaagagggcc 30

<210> 159
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 159
ggccctcttt ggaggcgcag agggccactg 30

<210> 160
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 160
ccctctgcat ctccgcagag ggccgcccac 30

<210> 161
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 161
gtgggcggcc ctctgcggag atgcagaggg 30

<210> 162
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 162
cccggatctc ctgggcctca tccctggact 30

<210> 163
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 163
agtccaggga tgaggcccag gagatccggg 30

<210> 164
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 164
tctcatccct ggacgcggaa gccaaagaga 30

<210> 165
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 165
tctctttggc ttccgcgtcc agggatgaga 30

<210> 166
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 166
ctgggaagcc aaagcgactc aggtgtcag 29

<210> 167

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 167
ctgacacctg agtcgctttg gcttcccag 29

<210> 168
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 168
ctcaggtgtc aggggccctg gccggaact 29

<210> 169
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 169
agttccggcc agggcccctg acacctgag 29

<210> 170
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 170
gagcagatgg tgtcgcggtc acctgcaaa 29

<210> 171
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 171
tttgcaggtg accgcgacac catctgctc 29

<210> 172
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 172
tcacggtcac ctgcgcagtg gagcatgaga 30

<210> 173
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 173
tctcatgctc cactgcgcag gtgaccgtga 30

<210> 174
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 174
cttcgaggaa ccaggcctga tacctgtga 29

<210> 175
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 175
tcacaggtat caggcctggt tcctcgaag 29

<210> 176
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 176
caaaagcttg ccgccaccat gaaacacctg tggttcttc 39

<210> 177
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 177
aaaatgaatt ctcatttacc cggagacag 29

<210> 178
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 178
ataaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gtc 33

<210> 179
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 179
ccggaattcc taacactctc ccctgttgaa gctctttg 38

<210> 180
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 180
caaaagcttg ccgccaccat ggaarcccca gckcag 36

<210> 181
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 181
caaaagcttg ccgccaccat ggaactgggg ctccg 35

<210> 182
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 182
caaaagcttg ccgccaccat gttgccatca 30

<210> 183
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 183
aagtagtcct tgaccaggc 19

<210> 184
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 184

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 185
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 185

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 186
<211> 12
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Asp Gly Gly Asp Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 187
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 187

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

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ala Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Asp Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 188
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 188
agttactact ggagc 15

<210> 189

<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 189
tatatctatt acagtgggag caccaaccac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 190
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 190
gatggtgggg acgactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 191
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 191
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

atctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caaccacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgg ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatggtggg 300

gacgactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 192
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 192

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 193
<211> 7

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 193

Asp Ala Ser Ser Leu Xaa Ser
1 5

<210> 194
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 194

Gln Gln Xaa Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr
1 5

<210> 195
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(91)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (96)..(96)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 195

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Xaa Ser Gly Xaa Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Asn Ser Tyr Pro Xaa
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 196
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 196
cgggcragtc agggcattag cagygsktta gcc 33

<210> 197
<211> 21

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 197
gatgcmtcca gtttgsaaag t 21

<210> 198
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 198
caacagtwta atagttaccc tyggacg 27

<210> 199
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 199
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgyc gggcragtca gggcattagc agygskttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagytcct gatctatgat gcmtccagtt tgsaaagtgg grtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcatcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag twtaatagtt accctyggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 200
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 200

Ser Tyr Tyr Trp Thr
1 5

<210> 201
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 201

Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 202
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 202

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 203
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 203

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 204
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 204
agttactact ggacc 15

<210> 205
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 205
tatgtctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 206
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 206
gaccctgggg aagactacta ctacggtatg gacgtc 36

<210> 207
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 207
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattggatat gtctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 208
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 208

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 209

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

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

<400> 210

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 211
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 211

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 212
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 212
cgggcaagtc agggcattag cagtgsttta gcc 33

<210> 213
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 213
gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 214
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 214
caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 215
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 215
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgstttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 216
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 216

Ser Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 217
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 217

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 218
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 218

Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 219
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 219

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 220
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 220
agctataaca tgaac 15

<210> 221
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 221
tccattagta gtagtagtag ttacatatac tacgcagact cagtgaaggg c 51

<210> 222
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 222
gattactatg gttcggggac ttattatctc tttgactac 39

<210> 223
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 223
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggGtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctataaca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180

gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagattac 300

tatggttcgg ggacttatta tctctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcc 369

<210> 224
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 224

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 225
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 225

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 226

His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile Thr
1 5

<210> 227
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 227

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 228
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 228
cgggccagtc agagcattgg tagtagctta cac 33

<210> 229
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 229
tatgcttccc agtccttctc a 21

<210> 230
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 230
catcagagta ggagtttacc gatcacc 27

<210> 231
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 231
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtaggagtt taccgatcac cttcggccaa 300

gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 232
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 232

Ser Tyr Tyr Trp Thr
1 5

<210> 233
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 233

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 234
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 234

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 235
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 235

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 236
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 236
agttactact ggacc 15

<210> 237
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 237
tatatctatt acagtgggag caccaactcc aacccctccc tcaagagt 48

<210> 238
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 238
gaccctgggg aagactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 239
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 239
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cttgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactccaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 240
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 240

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 241
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 241

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 242
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 242

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 243
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 243

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 244
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 244
cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 245
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 245
gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 246
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 246
caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 247
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 247
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 248
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 248

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 249
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 249

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 250
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 250

Asp Ala Gly Glu Asp Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 251
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 251

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 252
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 252
agttactact ggagc 15

<210> 253
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 253
tatatctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 254
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 254
gatgctgggg aggactactc ctacggtatg gacgtc 36

<210> 255
<211> 363
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 255
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctagtgc ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgctggg 300

gaggactact cctacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 256
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 256

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 257
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 257

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 258
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 258

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Arg Thr
1 5

<210> 259
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 259

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 260
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 260
cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 261
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 261
gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 262
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 262
caacagttta atagttaccg gacg 24

<210> 263

<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 263
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accggacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 264
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 264

Ser Tyr Tyr Trp Thr
1 5

<210> 265
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 265

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 266
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 266

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 267
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 267

312.

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 268
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 268
agttactact ggacc 15

<210> 269
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 269
tatatctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 270
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 270

gaccctgggg aagactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 271
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 271
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cttgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 272
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 272

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 273
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 273

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 274
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 274

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 275
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 275

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 276
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 276
cgggcragtc agggyattag cagygcttta gcc 33

<210> 277
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 277
gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 278
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 278
caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 279
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 279
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcragtca gggyattagc agygctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 280
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 280

Ser Tyr Xaa Trp Thr
1 5

<210> 281
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 281

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 282
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 282

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 283
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 283

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Xaa Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 284
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 284

agttacwact ggacc 15

<210> 285
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 285
tatatctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 286
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 286
gaccctgggg aagactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 287
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 287
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cttgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacwact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 288
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 288

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 289
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 289

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 290
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 290

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 291
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 291

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 292
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 292
cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 293
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 293
gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 294
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 294
caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 295
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 295
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 296
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 296

Ser Tyr Tyr Trp Thr
1 5

<210> 297
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 297

Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 298
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 298

Gly Ile Ala Gly Met Asp Val
1 5

<210> 299
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 299

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Cys Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gly Ile Ala Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 300
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 300
agttactatt ggacc 15

<210> 301
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 301
tatatctttt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 302
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 302
ggtatagcag gtatggacgt c 21

<210> 303
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 303
caggtgcaac tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcaga agttactatt ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atcttttaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtgctccctg 240

aagctgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgaa aggtatagca 300

ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctcagcc 348

<210> 304
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 304

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

325

<210> 305
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 305

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 306
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 306

His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile Thr
1 5

<210> 307
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 307

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 308
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 308
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

<210> 309
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 309
ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 310
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 310
cagcagtatg gtagctcacc gtacact 27

<210> 311
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 311
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 300

caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 312
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 312

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

<210> 313
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 313

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

<210> 314
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 314
atgaaacacc tgtggttctt c 21

<210> 315
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 315
atggaaaccc cagcgcag 18

<210> 316
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 316
ggatgaattc tcatttaccc ggagacaggg 30

<210> 317
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 317
ccggaattcc taacactctc ccctgttg 28

TABLE 18

Clone Name	Nec9-211-2	Nec10-1953-2	Nec1-108-1	Nec1-141-3	Nec1-209-3	Nec1-603-2	Nec9-1502-2	Nec10-1666-1	Nec10-1707-3	Nec10-1861-1	Nec10-2005-1	Nec10-2439-2
Nectin-2ED-Fc	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Q37A	95	99	102	107	117	96	91	100	99	91	87	89
Q45A	88	92	94	87	99	116	77	99	93	77	94	86
H55A	82	100	88	91	96	112	61	96	93	70	88	69
V60A	90	103	103	77	111	126	91	99	105	85	103	94
Y64A	87	78	96	80	104	122	91	97	101	83	100	94
Q71A	88	96	98	75	100	117	88	98	95	91	105	96
N78A	90	95	63	89	23	79	23	66	44	16	37	26
K88A	86	92	97	99	94	115	98	105	118	98	105	96
S95A	106	103	117	108	105	138	100	109	92	101	85	82
K109A	98	105	119	98	113	137	88	111	112	105	102	103
E117A	90	100	106	114	106	126	95	103	101	101	102	96
D122A	93	102	103	96	102	126	99	103	107	87	102	95
H128A	94	98	102	99	100	120	91	100	98	83	101	95
F145A	-7	-3	134	158	136	147	135	131	143	140	139	123
K147A	90	82	102	103	97	117	92	100	94	80	98	82
M153A	102	102	101	178	90	120	106	104	104	100	97	84

Clone Name	Nec9-211-2	Nec10-1953-2	Nec1-141-3	Nec1-520-1	Nec1-530-1	Nec1-603-2	Nec1-845-2	Nec1-903-1	Nec10-1666-1	Nec10-1707-3	Nec10-2005-1	Nec1-209-3	Nec1-244-3	Nec1-834-1	Nec9-1502-2	Nec10-1861-1	Nec10-2439-2
Nectin-2ED-Fc	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P40G	113	115	107	130	138	136	146	138	101	132	121	113	121	123	107	116	127
A75G	118	120	99	80	73	85	78	92	77	70	56	62	7	45	51	16	49
P76G	114	111	90	-2	-6	-9	-13	-4	-4	-10	-6	-1	-18	-9	-2	-28	-14
A77G	102	113	161	99	103	116	102	98	91	91	82	102	113	123	90	104	75
N78A	104	114	127	57	68	84	59	73	84	63	49	35	12	57	29	29	35
H79A	114	129	142	145	135	165	167	150	114	152	162	104	141	127	118	133	142
Q80A	110	121	134	139	134	157	151	141	116	126	132	119	133	145	110	129	126
N81A	109	136	195	155	150	185	188	147	126	174	179	131	195	191	133	174	180
N137A	124	122	285	114	91	127	112	121	99	110	105	86	60	32	69	68	80
F145A	-1	-2	270	134	138	165	141	124	120	163	176	139	187	182	132	182	168
V150A	109	98	183	161	146	185	179	166	127	157	159	133	173	182	131	175	163
T154A	120	119	95	160	136	170	160	160	119	153	155	123	132	146	120	156	167

AGENTE PARA PREVENIR/TRATAR EL CÁNCER

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal contra nectina-2 y el uso del mismo y más particularmente, a un agente para prevenir/tratar el cáncer o un agente diagnóstico para el cáncer, un promotor de apoptosis de las células cancerosas, un inhibidor del crecimiento de las células cancerosas y un agente citotóxico contra las células cancerosas a través de un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo.

Campo de la invención

Se ha informado que en el cáncer se podrían evaluar sus condiciones patológicas por los datos del perfil de micromatrices para el gen. En efecto en leucemia, se ha informado que esta se puede clasificar por los perfiles de expresión génica. Asimismo se considera posible predecir la respuesta a una terapia de cáncer particular o descubrir una nueva proteína como blanco de un fármaco para un cáncer particular por medio de la aclaración del perfil de expresión génica de cada tejido canceroso y la acumulación de su clasificación. Específicamente, cuando se observa la expresión aumentada de una determinada proteína en un determinado cáncer, se vuelve posible inducir actividad anti-tumoral en pacientes recientemente diagnosticados como positivos al antígeno, por medio de (i) reducir el nivel de expresión de la proteína, (ii) suprimir la función de la proteína, (iii) estimular la respuesta inmune de un huésped a la proteína, etc. Al mismo tiempo, los pacientes diagnosticados como negativos para el antígeno se pueden cambiar inmediatamente a otra terapia para el cáncer, lo cual supone eliminar la preocupación de imponer una carga superflua a los pacientes. Como tal, se espera que el análisis del perfil de expresión contribuya mucho al diagnóstico molecular

de un cáncer y desarrollo de fármacos terapéuticos basados en blancos moleculares.

El gen de la nectina-2α (SecRef Acceso No. NM_002856) y el gen de la nectina-2δ (EMBL Acceso No. X80038) son genes clonados del ADNc derivado de la línea celular de leucemia humana TF-1 y codifican proteínas que consisten en 479 aminoácidos y 538 aminoácidos, respectivamente (RefSeq Acceso No. NP_002847 y EMBL Acceso No. CAA56342). El gen de la nectina-2δ es una variante de empalme del gen de la nectina-2α y la proteína codificada por el gen de nectina-2δ tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos 1 a 350 de una proteína codificada por el gen de la nectina-2α pero es diferente en la secuencia de aminoácidos ubicada en y después del aminoácido 351 de la porción C-terminal. Además, los genes de ratones (GenBank Acceso No. BC009088 y RefSeq Acceso No. NM_008990) que muestran homología con el gen de la nectina -2α y el gen de la nectina-2δ se clonan a partir de una genoteca derivada de las células ES de ratón y codifican proteínas que consisten en 467 aminoácidos y 530 aminoácidos, respectivamente (GenBank Acceso No. AAH09088 y RefSeq Acceso No. NP_033016). Estos genes de nectina-2 de ratón presentan homología de aproximadamente 72% y aproximadamente 72% en términos de secuencias de bases y aproximadamente 69% y aproximadamente 73% en términos de secuencias de aminoácidos, con el gen de nectina-2α y nectina-2δ humanos, respectivamente. La nectina-2α y nectina-2δ (de aquí en adelante algunas veces denominadas colectivamente nectina-2) son moléculas proteicas también llamadas PVRL2, PRR2, PVRR2, HveB, CD112, etc. y pertenecen a la familia de nectina que consiste en cuatro miembros, nectina-1, nectina-2, nectina-3 y nectina-4 (de aquí en adelante algunas veces denominadas colectivamente como

331

nectina); y Nec1-1, Nec1-2, Nec1-3, Nec1-4 y Nec1-5, las cuales son conocidas como proteínas de membrana que tienen una estructura semejante a nectina (J. Biol. Chem. (2004), 279 (17), p18015-p18025).

La nectina pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y es una glicoproteína de transmembrana única que tiene 3 bucles tipo inmunoglobulina en la región extracelular. Se considera que las moléculas de nectina deben formar dímeros cis en las membranas celulares y los dímeros cis de las membranas celulares interactúan en trans con otros para regular la adhesión célula-célula entre las células epiteliales o entre las espermátidas y las células de Sertoli en un modo independiente de la concentración de Ca^{2+} (Protein, Nucleic Acid and Enzyme (2003), 48 (2), p105-p112; Curr. Biol. (2002), 12, p1145-p1150). También se ha informado que la nectina-1 y nectina-3 desempeñan un papel en la formación de sinapsis por medio de la unión trans (J. Cell Biol. (2002), 156, p555-p565). Se sabe que la unión trans de las nectinas se forma homofílicamente entre las moléculas iguales, mientras que la unión trans heterofílica también se forma entre nectina-1 y nectina-3, nectina-1 y nectina-4, nectina-2 y nectina-3 además de la nectina-3 y Nec1-5 (J. Biol. Chem. (2002), 277 (30), p27006-p27013). También se sabe que la nectina se une a afadina en la región del extremo C-terminal intracelular y se conecta con el citoesqueleto de la actina a través de la molécula (J. Cell Sci. (2003), 116 (1), p17-p27).

Como función fisiológica de las nectinas diferentes de la adhesión celular, se informa que por ejemplo, la nectina-1 actúa como un receptor para la glicoproteína D que se expresa en los virus del herpes para funcionar como una entrada del herpes viral en las células (J. Cell Sci. (2003), 116 (1), p17-p27). Asimismo, la nectina-2 es uno de los ligandos de DNAM-1 (CD226) que se

expresa en las células citolíticas naturales y se considera que las células citolíticas naturales que expresan DNAM-1 u inducen citotoxicidad después del compromiso con la nectina-2 expresada en las células blanco (J. Exp. Med. (2003), 198 (4), p557-p567). Además, se informa que la nectina-2 es uno de los genes involucrados en la vía del gen p53 supresor del tumor (WO 02/99040), una proteína de unión a nectina-3 que es una proteína útil para tratar los trastornos de angiogénesis, cáncer o infección viral (WO 02/28902), un receptor involucrado en infección viral (WO 99/63063),uno de los genes que son útiles para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mamas y cáncer ovárico (WO 02/00677), uno de los 16 genes promisorios, cuya expresión está aumentada en diversos cánceres y son promisorios como un blanco para anticuerpos terapéuticos antitumorales (WO 03/088808) además de los genes cuya expresión está aumentada en el tejido canceroso y son promisorios para el diagnóstico y prevención del cáncer (WO 04/030615). El gen Nectina-2 se descubrió como un gen cuya expresión estaba marcadamente aumentada en tejidos cancerosos. Se informa que el oligonucleótido anti-sentido del gen estimula la apoptosis en células cancerosas (WO 2005/097204). Como anticuerpos monoclonales contra nectina-2, se han informado anticuerpos monoclonales de ratón o rata contra nectina-2 (Blood (1998), 92(12), p4602-p4611; J. Virol. (2000) 74 (3) p1267-p1274; Intl. Immunol. (2004) 16 (4), p533-p538; Mol. Immunol. (2005) 42, p463-p469; JEM (2003) 198 (4), p557-p567; Virol. (1998) 246, p179-p189; J. Virol. (2001) 75 (2) p11185-p11195, FEBS (2005) 579, p2243-2249); y anticuerpos monoclonales contra nectina-2 de ratón (J. Virol. (2001) 75(2) p11185-p11195; JBC (2001) 276, p48350-p48355; Oncogene (1999) 18, p1609-p1617; JCB (1999) 145, p539-p549; Exp. Cell Res. (1997) 235, p374-p384). Sin embargo, ninguno de estos informes se refirió a la actividad

inhibidora del crecimiento de estos anticuerpos contra las células cancerosas.

Descripción de la invención

Los fármacos contra el cáncer existentes se acompañan invariablemente de efectos secundarios. En los sitios de trabajo clínico, se buscan con gran interés fármacos seguros que actúen en forma específica sobre las células cancerosas, presenten el menor efecto sobre los tejidos normales e induzcan la inhibición del crecimiento de células cancerosas.

Con el fin de resolver los problemas precedentes, Los presentes inventores realizaron estudios de gran alcance y como resultado, hallaron el gen de nectina-2, como un gen cuya expresión aumenta marcadamente en los tejidos cancerosos y también encontraron que el oligonucleótido antisentido de este gen induce la apoptosis en las células cancerosas. Los inventores también han logrado producir anticuerpos monoclonales contra la nectina-2 y hallaron que los anticuerpos monoclonales presentan una excelente actividad inhibidora del crecimiento y etcétera contra las células cancerosas. Como resultado de investigaciones adicionales basadas en estos hallazgos, los inventores han logrado realizar la presente invención.

Más específicamente, la presente invención se refiere a las siguientes características:

[1] un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α)o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ), su péptido parcial o una sal del mismo;

[2] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ), su

péptido parcial o una sal del mismo;

[3] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal humano;

[4] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal quimérico;

[5] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal humanizado;

[6] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal donde la región constante del anticuerpo pertenece a la subclase de IgG_1 humana;

[7] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, el cual tiene actividad inhibidora del crecimiento de la célula cancerosa;

[8] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que presenta citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC);

[9] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que tiene actividad inhibidora de la unión trans de nectina-2/nectina-3 o nectina-2/nectina-2;

[10] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el epítope presente en la secuencia de aminoácidos 1-350 (región extracelular) de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ);

[11] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el epítope presente en la secuencia de aminoácidos de 47-142 (primer dominio tipo inmunoglobulina) o 175-240 (segundo dominio tipo inmunoglobulina) en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ);

[12] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la secuencia de aminoácidos que contiene por lo menos un residuo de aminoácidos de los residuos

935.

de aminoácidos 75, 76, 77, 78, 95, 137, 145, 173, 184, 186 y 212 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ);

[13] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, donde el anticuerpo se une en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula del hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1(FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1(FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), a la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo;

[14] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es capaz de reconocer la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo monoclonal producida por la célula del hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427) o Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[15] una célula del hibridoma, que es capaza de producir el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior;

[16] la célula del hibridoma de acuerdo con [15] anterior, que está representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3

336

(FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[17] un anticuerpo monoclonal producido por la célula del hibridoma de acuerdo con [16];

[18] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, que es un anticuerpo monoclonal recombinante;

[19] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) el número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente;

[19a] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o

sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 y SEQ ID NO: 186, respectivamente;

[19b] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201 y SEQ ID NO: 202, respectivamente;

[19c] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217 y SEQ ID NO: 218, respectivamente;

[19d] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 y SEQ ID NO: 234, respectivamente;

[19e] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las

secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 y SEQ ID NO: 250, respectivamente;

[19f] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265 y SEQ ID NO: 266, respectivamente;

[19g] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281 y SEQ ID NO: 282, respectivamente;

[19h] el anticuerpo de acuerdo con [19] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena

339

pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297 y SEQ ID NO: 298, respectivamente;

[20] el anticuerpo de acuerdo con [1] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente.

[20a] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 y SEQ ID NO: 194, respectivamente;

[20b] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de

340

complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 y SEQ ID NO: 210, respectivamente;

[20c] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225 y SEQ ID NO: 226, respectivamente;

[20d] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241 y SEQ ID NO: 242, respectivamente;

[20e] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de

aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257 y SEQ ID NO: 258, respectivamente;

[20f] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273 y SEQ ID NO: 274, respectivamente;

[20g] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289 y SEQ ID NO: 290, respectivamente;

[20h] el anticuerpo de acuerdo con [20] anterior, donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305 y SEQ ID NO: 306, respectivamente;

[21] un agente de diagnóstico, que comprende un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o

342

sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo;

[22] el agente de diagnóstico de acuerdo con [21] anterior, que es un agente de diagnóstico para el cáncer;

[23] un medicamento, que comprende un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo;

[24] el medicamento de acuerdo con [23], que es un agente para prevenir/tratar el cáncer;

[25] el medicamento de acuerdo con [23] anterior, que es un inductor de apoptosis de las células cancerosas;

[26] el medicamento de acuerdo con [23] anterior, que es un inhibidor del crecimiento de las células cancerosas;

[27] el medicamento de acuerdo con [23] anterior, que es un agente citotóxico contra las células cancerosas donde se usa el mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo;

[28] un método para prevenir/tratar el cáncer, que comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo ;

[29] un método para inducir apoptosis de las células cancerosas, que comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la

343.

SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo ;

[30] un método para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo ;

[31] un método de destrucción de células cancerosas a través de un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo, que comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo;

[32] el uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo, en la fabricación de un agente para prevenir /tratar cáncer;

[33] el uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo, en la fabricación de un inductor de las células cancerosas;

[34] el uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del

mismo, en la fabricación de un inhibidor del crecimiento de las células cancerosas;

[35] el uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo, en la fabricación de un agente citotóxico contra las células cancerosas a través de un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo y similares.

[36] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama que comprende un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[37] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama que comprende un anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685);

[38] El agente para prevenir o tratar el cáncer de mama de acuerdo con el enunciado [37] anterior, donde el anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con un

345

anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-554-1 (FERM BP-10681) es Nec1-1044-4 (FERM BP-10805) o Nec1-1302-2 (FERM BP-10684);

[39] El agente para prevenir o tratar el cáncer de mama de acuerdo con el enunciado [37] anterior, donde el anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) es Nec8-3704-7 (FERM BP-10807) o Nec8-3517-11 (FERM BP-10806);

[40] Un método para prevenir o tratar el cáncer de mama de acuerdo con los enunciados [36] o [37] anteriores, donde se utiliza un mecanismo de defensa del hospedante mediado por la región Fc del anticuerpo;

[41] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, que comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente;

[42] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, que comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1),

346.

la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente;

[43] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, que comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente; donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena

liviana de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente; y una región constante de dicho anticuerpo;

[44] Una célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807);

[45] Un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma de acuerdo con el enunciado [44] anterior;

[46] Un anticuerpo monoclonal que se une en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807);

[47] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con los enunciados [45] o [46] anteriores;

[48] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, que comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) un número de

identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente;

[49] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el cual comprende un anticuerpo que se enlaza competitivamente con un anticuerpo en donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), de la segunda región determinante de complementariedad (CDR2), y de la tercera región determinante de complementariedad (CDR3), en una región de cadena liviana variable de dicho anticuerpo, comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente;

[50] Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, que comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) un número de

identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente; donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305 y (vi) un número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente; y una región constante de dicho anticuerpo, etc. El anticuerpo monoclonal contra la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo, se puede usar seguramente, por ejemplo, como un agente para prevención/tratamiento, por ejemplo, cáncer (por ej., cáncer colorrectal, cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer de las vías biliares, cáncer del bazo, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer

350

de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, tumor sanguíneo, etc.), (con preferencia un agente para prevenir/tratar el cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer pancreático, etc.), un inductor de apoptosis de las células cancerosas, un inhibidor del crecimiento de las células cancerosas, un inductor de cambios en el ciclo celular de las célula cancerosas, un agente citotóxico contra las células cancerosas que utilizan un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo, un agente citotóxico dependiente del anticuerpo contra las células cancerosas, etc.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS: 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283 y 299) de la región de cadena variable pesada (H) y las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS: 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291 y 307) en la región variable de la cadena liviana (L), del anticuerpo de la presente invención obtenido en el EJEMPLO 1.

La FIG. 2 muestra las secuencias base (SEQ ID NOS: 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287 y 303) de la región variable de la cadena H del anticuerpo de la presente invención obtenido en el EJEMPLO 1.

FIG. 3 muestra las secuencias base (SEQ ID NOS: 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295 y 311) en la región variable de la cadena L del anticuerpo de la presente invención obtenido en el EJEMPLO 1.

La FIG. 4 muestra cambios en el volumen medio del tumor con el transcurso del tiempo luego del trasplante de la línea celular tumoral del EJEMPLO 23.

MODALIDAD DE LA INVENCIÓN

La proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos

351

representada por la SEQ ID NO: 1 (de aquí en adelante denominada nectina-2α) o la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 (de aquí en adelante denominada nectina-2δ) (de aquí en adelante, estas proteínas se mencionan algunas veces colectivamente como nectina-2 o la proteína de la presente invención), puede ser alguna proteína derivada de algunas células (por ej., hepatocitos, esplenocitos, células nerviosas, células gliales, células β de páncreas, células de médula ósea, células mesangiales, células de Langerhans, células epidérmicas, células epiteliales, células caliciformes, células endoteliales, células del músculo liso, fibroblastos, fibrocitos, miocitos, células grasas, células inmunes (por ej., macrófagos, células T, células B, células citolíticas naturales, células mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, etc.), megacariocitos, células sinoviales, condrocitos, células óseas, osteoblastos, osteoclastos, células de la glándula mamaria, hepatocitos o células intersticiales, las correspondientes células precursoras, células madre, células cancerosas, etc.), o alguno de los tejidos donde tales células están presentes, por ej., cerebro o cualquier región el cerebro (por ej., bulbo olfatorio, núcleo amigdaloideo, ganglios basales, hipocampo, tálamo, hipotálamo, corteza cerebral, bulbo raquídeo, cerebelo), médula espinal, hipófisis, estómago, páncreas, riñón, hígado, gónada, tiroides, vesícula, médula ósea, glándula adrenal, piel, músculo, pulmón, aparato gastrointestinal (por ej., intestino grueso e intestino delgado), vasos sanguíneos, corazón, timo, bazo, glándula submandibular, sangre periférica próstata, testículos, ovario, placenta, útero, hueso, articulaciones, músculo esquelético etc., de seres humanos y animales de sangre caliente (por ej., cobayos, ratas, ratones, aves, conejos, cerdo, ovejas, bovinos,

352.

monos, etc.). La proteína también puede ser una proteína sintética.

La secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma secuencia de aminoácidos que la representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 incluye a las secuencias de aminoácidos que tienen por lo menos aproximadamente 50% de homología, con preferencia por lo menos aproximadamente 60% de homología, con más preferencia por lo menos aproximadamente 70% de homología, aun con más preferencia por lo menos aproximadamente 80% de homología, con mucha más preferencia por lo menos aproximadamente 90% de homología y con la máxima preferencia por lo menos aproximadamente 95% de homología con la secuencia de aminoácidos que se muestra por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

Los ejemplos preferidos de la proteína que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 incluye a las proteínas que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 y que tiene una propiedad sustancialmente equivalente a la de la proteína que contiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, etc.

La homología de las secuencias de aminoácidos se puede medir empleando un algoritmo de puntaje de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) en las siguientes condiciones (un valor esperado = 10; brechas permitidas; matriz = BLOSUM62; filtración = OFF).

Sustancialmente equivalente se usa para significar que la naturaleza de estas propiedades es equivalente en términos de calidad (por ej., desde el punto de vista fisiológico o

353

farmacológico). De este modo, la actividad de la proteína de la presente invención es con preferencia equivalente (por ej., aproximadamente 0.01 a 100 veces, con preferencia aproximadamente 0.1 a 10 veces, con más preferencia 0.5 a 2 veces), pero las diferencias de factores cuantitativos tales como grado de estas actividades y un peso molecular de la proteína pueden ser permisibles.

Los ejemplos de nectina-2 incluyen las llamadas muteínas tales como las proteínas que tienen (i) la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en la cual se suprimen por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con máxima preferencia varios (1 a 5)) aminoácidos; (ii) la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en la cual se agregan por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5)) aminoácidos; (iii) la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en la cual se insertan por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5)) aminoácidos; (iv) la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en al cual por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5))

aminoácidos está sustituidos por otros aminoácidos; o (v) una combinación de estas secuencias de aminoácidos y similares.

Cuando la secuencia de aminoácidos se inserta, suprime o sustituye como se describió anteriormente, la posición de su inserción, supresión o sustitución no está particularmente limitada.

A lo largo de esta memoria descriptiva, las proteínas están representadas de acuerdo con la forma convencional de describir los péptidos, es decir, el extremo N-terminal (extremo amino) de la izquierda y el extremo C-terminal (extremo carboxilo) de la derecha. En la proteína usada en la presente invención que incluye la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, el extremo C-terminal puede extraer en forma de un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato (COO^-), una amida ($-CONH_2$) y un éster (-COOR).

En la presente memoria, los ejemplos del grupo éster mostrados por R incluyen un grupo alquilo C_{1-6} tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc.; un grupo cicloalquilo C_{3-8} tal como ciclopentilo, ciclohexilo, etc.; un grupo arilo C_{6-12} tal como fenilo, α-naftilo, etc.; un grupo aralquilo C_{7-14} tal como un grupo fenil C_{1-2}alquilo tal como grupo bencilo, fenetilo, etc.; un grupo α-naftilalquilo C_{1-2} tal como α-naftilmetilo, etc.; pivaloiloximetilo y similares.

Cuando la nectina-2 contiene un grupo carboxilo (o un carboxilato) en una posición diferente del extremo C-terminal, el grupo carboxilo puede estar amidada o esterificada y tal amida o éster incluida en la nectina-2 usada en la presente invención. Los ejemplos del grupo éster en este caso puede ser los ésteres del extremo C-terminal descritos anteriormente, etc.

Además, los ejemplos de nectina-2 incluyen variantes donde el grupo amino de los residuos de aminoácidos del extremo N-terminal (por ej., residuo de metionina) está protegido con un grupo

protector (por ej., un grupo acilo C_{1-6} tal como un grupo alcanoílo C_{1-6}, por ej., grupo formilo, grupo acetilo, etc.); aquellos donde la región del N-terminal se escinde in vivo y el grupo glutámico formado de este modo es piroglutaminado; aquellos donde un sustituyente (por ej., -OH, -SH, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, grupo guanidino, etc.) de la cadena lateral de un aminoácido de la molécula está protegido con un grupo protector adecuado (por ej., un grupo acilo C_{1-6} tal como un grupo alcanoílo C_{1-6}, por ej., grupo formilo, grupo acetilo, etc.), o proteínas conjugadas tales como glicoproteínas que tienen cadenas de azúcares; etc.

Los ejemplos específicos de nectina-2 incluyen una proteína (nectina-2α) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, una proteína (nectina-2δ) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y similares.

El péptido parcial de nectina-2 puede ser algún péptido siempre que este sea un péptido parcial de nectina-2 descrito anteriormente y con preferencia tiene la propiedad equivalente al de la nectina-2 descrita anteriormente.

Por ejemplo, en la secuencia de aminoácidos constituyentes de nectina-2 se pueden usar péptidos que contienen, por ej., por lo menos 20, con preferencia por lo menos 50, con más preferencia por lo menos 70, con mucha más preferencia por lo menos 100 y con la máxima preferencia por lo menos 200 aminoácidos.

El péptido parcial de la nectina-2 usado en la presente invención pueden ser péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos, de la cual por lo menos 1 o 2 (con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 20, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5)) aminoácidos pueden ser suprimidos; péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos, en las cuales

por lo menos 1 o 2 (con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 20, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5) aminoácidos pueden ser agregados; péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos en las cuales se pueden insertar por lo menos 1 o 2 (con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 20, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5) aminoácidos o péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos, en las cuales por lo menos 1 o 2 (con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 20, con más preferencia varios y con la máxima preferencia (aproximadamente 1 a aproximadamente 5) aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos.

En el péptido parcial de la nectina-2, el extremo C-terminal puede estar en forma de un grupo carboxilo (-COOH), un carboxilato ($-COO^-$), una amida ($-CONH_2$) o un éster (-COOR).

Además, el péptido parcial de la nectina-2 incluye a los que tienen un grupo carboxilo (o un carboxilato) en la posición diferente del extremo C-terminal, a aquellos donde el grupo amino de los residuos de los aminoácidos N-terminales (por ej., residuo de metionina) está protegido con un grupo protector; aquellos donde la región del N-terminal se escinde in vivo y el grupo glutámico formado de este modo es piroglutaminado; aquellos donde un sustituyente de la cadena lateral de un aminoácido de la molécula está protegido con un grupo protector adecuado o péptidos conjugados tales como los llamados glicopéptidos en los cuales los azúcares están conjugados; etc., como en la nectina-2 descrita anteriormente.

Como sales de nectina-2 o sus péptidos parciales, se pueden usar sales con ácidos aceptables para uso fisiológico (por ej.,

ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos) o bases (por ej., sales de metales alcalinos), con preferencia en forma de sales de adición con ácidos aceptables para uso fisiológico. Los ejemplos de tales sales incluyen sales con ácidos inorgánicos (por ej., ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico), sales con ácidos orgánicos (por ej., ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metansulfónico, ácido bencensulfónico), y similares.

Los anticuerpos monoclonales contra nectina-2, su péptido parcial o las sales del mismo (de aquí en adelante denominada el anticuerpo de la presente invención) pueden ser anticuerpos monoclonales, siempre que estos sean anticuerpos capaces de reconocer nectina-2, su péptido parcial o las sales del mismo. Entre ellos, se usan con preferencia anticuerpos monoclonales humanos.

También, los ejemplos de los anticuerpos de la presente invención incluyen a los anticuerpos monoclonales (específicamente, anticuerpos monoclonales humanos) contra nectina-2δ, su péptido parcial o las sales del mismo.

Además, los anticuerpos que tienen por lo menos una de la siguientes propiedades (1) a (8) se emplean con preferencia como el anticuerpo de la presente invención.

(1) Un anticuerpo que presenta la actividad inhibidora del crecimiento contra las células cancerosas (por ej., células cancerosas humanas OV-90)

(2) Un anticuerpo que presenta citotoxicidad de celular dependiente del anticuerpo (ADCC)

(3) Un anticuerpo que tiene la actividad inhibidora contra la unión cis de nectina-2

Específicamente, estos anticuerpos:

358

(i) inhiben la unión homo-cis de nectina-2α;

(ii) inhiben la unión homo-cis de nectina-2δ; o

(iii) inhiben la unión hetero-cis de nectina-2α y nectina-2δ.

(4) Un anticuerpo que presenta actividad inhibidora contra la unión trans nectina-2/nectina-3 o nectina-2/nectina-2.

Específicamente, estos anticuerpos:

(i) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de nectina-2α y un homo-cis-dímero de nectina-2α;

(ii) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de nectina-2α y un homo-cis-dímero de nectina-2δ;

(iii) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de nectina-2α y un a hetero-cis-dímero de nectina-2δ;

(iv) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de nectina-2α a un homo-cis-dímero de la nectina-3;

(v) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de nectina-2δ y un homo-cis-dímero de la nectina-2δ;

(vi) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de la nectina-2δ y un hetero-cis-dímero de la nectina-2α y nectina-2δ;

(vii) inhiben la unión trans de un homo-cis-dímero de la nectina-2δ y un homo-cis-dímero de la nectina-3;

(viii) inhiben la unión trans de un hetero-cis-dímero de nectina-2α y nectina-2δ a un homo-cis-dímero de la nectina-3; o

(ix) inhiben la unión trans de un hetero-cis-dímero de nectina-2α y nectina-2δ a un hetero-cis-dímero de nectina-2α y nectina-2δ.

(5) Un anticuerpo que pertenece a alguno de los grupos de epítopes I a VII que se muestran en el EJEMPLO 4 o el subgrupo del epítope que se muestra en el EJEMPLO 18

Con preferencia, el anticuerpo pertenece al grupo del epítope IV, VI o VII que se muestra en el EJEMPLO 4. Con más preferencia, el anticuerpo pertenece al subgrupo del epítope IVb, VIb o VIIa que se muestra en el EJEMPLO 18.

359.

(6) Un anticuerpo que reconoce la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos que es reconocida por un anticuerpo monoclonal (anticuerpo que pertenece al grupo del epítope I, IV, V, VI o VII en la TABLA 4) producido por la célula de hibridoma representada por:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),

Nec1-244-3 (FERM BP-10423),

Nec1-530-1 (FERM BP-10424),

Nec1-903-1 (FERM BP-10425),

Nec1-520-1 (FERM BP-10426),

Nec1-845-2 (FERM BP-10427),

Nec1-834-1 (FERM BP-10428),

Nec1-964-1 (FERM BP-10683),

Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),

Nec1-554-1 (FERM BP-10681),

Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o

Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

En "la misma o sustancialmente la misma" secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos (de aquí en adelante el último aminoácido es mencionado simplemente como el epítope) que es reconocida por un anticuerpo monoclonal (anticuerpo que pertenece al epítope I, IV, V, VI o VII de la FIG. 4) producido por una célula de hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1(FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428, Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685)), el término "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que el epítope" incluye a (i) la secuencia de aminoácidos, de la cual se

suprimen por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos en el epítope; (ii) la secuencia de aminoácidos a la cual se agregan por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos en el epítope; (iii) la secuencia de aminoácidos en la cual se insertan por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos en el epítope; (iv) la secuencia de aminoácidos en la cual por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos en el epítope están sustituidos por otros aminoácidos; o (v) una combinación de (i)-(iv) secuencias de aminoácidos; y similares. La posición de su inserción, adición, supresión o sustitución descrita anteriormente no está particularmente limitada.

Más específicamente, el término "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que un epítope" incluye las secuencias de aminoácidos cercanos al epítope e incluye, por ejemplo, (i) la secuencia de aminoácidos en el cual por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos se agregan al lateral del extremo N-terminal del epítope; (ii) la secuencia de aminoácidos en la cual por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos se agregan al lateral del extremo N-terminal del epítope; (iii) la secuencia de aminoácidos en la cual por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos se agregan a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos (por ej., de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5)) se agregan al lateral N-terminal dentro del epítope; o (iv) la secuencia de aminoácidos en la cual

por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5) aminoácidos se agregan a la secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 10, con preferencia varios (1 a 5)) al lateral N-terminal dentro del epítope y similares.

Por ejemplo, cada anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) y se considera que otros anticuerpos monoclonales pertenecientes al mismo grupo al cual pertenece el anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente reconocen la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que dicho anticuerpo monoclonal.

(7) Anticuerpo que es competitivo con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),
Nec1-244-3 (FERM BP-10423),
Nec1-530-1 (FERM BP-10424),
Nec1-903-1 (FERM BP-10425),
Nec1-520-1 (FERM BP-10426),
Nec1-845-2 (FERM BP-10427),
Nec1-834-1 (FERM BP-10428),
Nec1-964-1 (FERM BP-10683),
Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),
Nec1-554-1 (FERM BP-10681),
Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o
Nec8-4116-8 (FERM BP-10685),

362

para la unión a nectina-2α o nectina-2δ.

En la presente memoria, el término "anticuerpo que es competitivo con un anticuerpo monoclonal producido por cada célula del hibridoma para la unión a nectina-2α o nectina-2δ" se refiere a un anticuerpo, que se une a nectina-2α o nectina-2δ que se inhibe competitivamente por el agregado de un exceso de alguno de los 12 anticuerpos descritos anteriormente. Específicamente, el anticuerpo se refiere a, por ejemplo, un anticuerpo que muestra aproximadamente 50-100% de inhibición de unión, cuando una cantidad 50 veces molar de alguno de los 12 anticuerpos descritos anteriormente se agrega a dicho anticuerpo.

(8) Un anticuerpo monoclonal que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),

Nec1-244-3 (FERM BP-10423),

Nec1-530-1 (FERM BP-10424),

Nec1-903-1 (FERM BP-10425),

Nec1-520-1 (FERM BP-10426),

Nec1-845-2 (FERM BP-10427),

Nec1-834-1 (FERM BP-10428),

Nec1-964-1 (FERM BP-10683),

Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),

Nec1-554-1 (FERM BP-10681),

Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o

Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

En la presente memoria, la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos (de aquí en adelante secuencia de aminoácidos A) del anticuerpo monoclonal descrito anteriormente incluye a la secuencias de

363.

aminoácidos que tienen por lo menos aproximadamente 50% de homología , con preferencia por lo menos aproximadamente 60% de homología, con más preferencia por lo menos aproximadamente 70% de homología, aún con más preferencia por lo menos aproximadamente 80% de homología, con mucha más preferencia por lo menos aproximadamente 90% de homología y con la máxima preferencia por lo menos aproximadamente 95% de homología, con la secuencia de aminoácidos A; etc.

Los ejemplos del anticuerpo que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos A incluye un anticuerpo que comprende sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos A y que tiene una actividad sustancialmente equivalente con la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos A; y similares.

La homología de las secuencias de aminoácidos se puede medir empleando un algoritmo de puntaje de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) en las siguientes condiciones (un valor esperado = 10; brechas permitidas; matriz = BLOSUM62; filtración = OFF).

El término sustancialmente equivalente se usa para significar que la naturaleza de estas propiedades es equivalente en términos de calidad (por ej., desde el punto de vista fisiológico o farmacológico). De este modo, la actividad de la proteína de la presente invención es con preferencia equivalente (por ej., aproximadamente 0.01 a 100 veces, con preferencia aproximadamente 0.1 a 10 veces, con más preferencia 0.5 a 2 veces), pero las diferencias en factores cuantitativos tales como el grado de estas actividades y el peso molecular de la proteína pueden ser permisibles.

364.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos A incluyen un anticuerpo que contiene (i) una secuencia de aminoácidos donde se suprime por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5) aminoácidos de la secuencia de aminoácidos A; (ii) una secuencia de aminoácidos donde se agregan por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5) aminoácidos a la secuencia de aminoácidos A; (iii) una secuencia de aminoácidos donde se insertan por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos A; (iv) una secuencia de aminoácidos donde por lo menos 1 o 2 (por ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 50, con preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 30, con más preferencia aproximadamente 1 a aproximadamente 10 y con la máxima preferencia varios (1 a 5) aminoácidos de la secuencia de aminoácidos A están sustituidos por otros aminoácidos o (v) una combinación de estas secuencias de aminoácidos y similares .

El anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano y fragmento de anticuerpo. El "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo que tiene las regiones variables derivadas del anticuerpo de especies diferentes de las regiones constantes del anticuerpo humano (ver,

por ej., EP 0125023, etc.). El "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo diseñado para modificar un anticuerpo heterólogo, como un anticuerpo de ratón, por reemplazo de su estructura primaria diferente de la regiones determinantes de complementariedad de la cadena H y cadena L con la estructura primaria correspondiente de un anticuerpo humano. El "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal preparado mediante un animal transgénico que porta genes de anticuerpos humanos (ver EP0546073) y un anticuerpo monoclonal preparado mediante una genoteca en la cual el gen del anticuerpo humano se presenta en al superficie celular del bacteriófago, Escherichia coli, levaduras, células de animales, etc., la llamada tecnología de despliegue de anticuerpos (Nature Biotechnology 23, 1105 (2005)) y un anticuerpo monoclonal aislado de células B humanas que producen un anticuerpo contra la nectina-2 utilizando el método de fusión celular, el método de despliegue de fagos o similares.

En la presente invención, el "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte del anticuerpo de longitud completa y generalmente significa un fragmento que contiene regiones de unión con el antígeno o regiones variables. El fragmento del anticuerpo incluye, por ejemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, un anticuerpo de cadena única (Fvsc), anticuerpo estabilizado por disulfuro (Fvsd), etc.

El anticuerpo de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención reconoce un epítope presente en la secuencia de los aminoácidos 1 a 350 (dominio extracelular) de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ); un epítope presente en las secuencias de aminoácidos 47 a 142 (primer dominio tipo inmunoglobulina) o en las secuencia de aminoácidos 175 a 240 (segundo dominio tipo inmunoglobulina) de la secuencia de aminoácidos representada por

la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ); o la secuencia de aminoácidos que contiene por lo menos un residuo de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos 75, 76, 77, 78, 95, 137, 145, 173, 184, 186 y 212 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o por la SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ).

La presente invención además proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos específica de la CDR o una secuencia de aminoácidos de la región variable. La presente invención también proporciona una cadena liviana del anticuerpo monoclonal o su fragmento y una cadena pesada del anticuerpo monoclonal o su fragmento, que comprende una secuencia de aminoácidos especifica de la CDR.

En los laterales N-terminales de las cadenas pesadas y livianas, existen regiones variables que se llaman región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena liviana (VL), respectivamente. En la región variable, existe una región determinante de complementariedad (CDR) y esta parte es responsable de la especificidad del reconocimiento de anticuerpo. Una parte de esta región variable diferente de la CDR actúa para retener la estructura de la CDR y se llama región estructural (FR). En los laterales C-terminales de las cadenas pesadas y livianas, existen regiones constantes que se llaman una región constante de cadena pesada (CH) y una región constante de cadena liviana (CL), respectivamente. En la región variable de cadena pesada, existen tres regiones determinantes de complementariedad: la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2), y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3). Las tres regiones determinantes de complementariedad de la región variable de cadena pesada se llaman colectivamente región determinante

de complementariedad de cadena pesada. Asimismo, existen tres regiones determinantes de complementariedad en la región variable de cadena liviana, las cuales son la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2), y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3). Estas tres regiones determinantes de complementariedad de la región variable de cadena liviana se llaman colectivamente una región determinante de complementariedad de cadena liviana.

Específicamente, en el anticuerpo de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), una segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y una tercera región determinante de complementariedad (CDR3) en una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) número de identificación de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) número de identificación de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) número de identificación de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente.

Además, en el anticuerpo de acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y una tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo

comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) número de identificación de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) número de identificación de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) número de identificación de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente.

Las secuencias de la CDR del anticuerpo de la presente invención no están limitadas necesariamente pero incluyen a las dadas en las TABLAS 21 y 22 descritas posteriormente, como combinaciones adecuadas de secuencias de aminoácidos de VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 y combinaciones adecuadas de secuencias de aminoácidos de VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3. Las secuencias de aminoácidos diferentes de la CDR no están limitadas particularmente pero el anticuerpo de la presente invención incluye un llamado anticuerpo con CDR injertado en el cual las secuencias de aminoácidos de la CDR diferentes derivan e otro anticuerpo, especialmente de un anticuerpo de diferente especie. Se prefieren las secuencias de aminoácidos derivadas de seres humanos con las secuencias de aminoácidos diferentes de la CDR y pueden estar acompañadas si es necesario, por la adición, supresión, sustitución y/o inserción de uno o más residuos de aminoácidos de la región estructural (FR).

La secuencia de aminoácidos y secuencia base de las regiones variables del anticuerpo de la presente invención son con preferencia las que se brindan en la TABLA 25.

El anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR específica o una secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo de la presente invención se puede

preparar mediante métodos conocidos.

El anticuerpo de la presente invención incluye con preferencia a un anticuerpo monoclonal, en el cual las regiones constantes del anticuerpo pertenecen con preferencia a un anticuerpo humano, con más preferencia a IgG humana y con la máxima preferencia a la subclase de IgG1 humana.

El anticuerpo contra nectina-2, su péptido parcial o sales del mismo (que algunas veces se denominan simplemente nectina-2 en la siguiente descripción del anticuerpo) se puede preparar por métodos conocidos públicamente para la fabricación de anticuerpos o antisueros.

La preparación de un antígeno para el anticuerpo de la presente invención y preparación del anticuerpo se describirá a continuación

(1) Preparación del antígeno

Como antígeno usado para preparar el anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, se puede usar cualquiera de los antígenos, tales como una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 (nectina-2), su péptido parcial o sales del mismo, una línea celular o su fracción de membrana donde la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 (nectina-2) está altamente expresada en forma natural o artificial, una proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2 y otra proteína o péptido o sales de los mismos, un péptido (sintético)que tiene uno o más determinantes antigénicos, que son los mismos que en nectina-2, etc. (de aquí en adelante estos antígenos algunas veces se denominan simplemente antígeno de la presente invención).

Los ejemplos específicos del antígeno de la presente invención, que se puede usar con preferencia, incluyen una línea

celular o su fracción de membrana donde la nectina-2 está altamente expresada en forma natural o artificial, un dominio extracelular de la proteína de nectina-2 o sales de la misma, una proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2 y otra proteína o péptido, o un péptido (sintético) que tiene uno o más determinantes antigénicos, que son los mismos que en la nectina-2, etc.

Ejemplos de la otra proteína o péptido incluyen FLAG-marca, His-marca, Myc-marca, V5-marca, GST-marca, S-marca, T7-marca, regiones Fc de anticuerpo humano, anticuerpo de ratón, etc., y demás.

Si bien la longitud de tal péptido (sintético) no está limitada siempre que sea una longitud tal que tenga inmunogenicidad, el péptido es con preferencia un péptido que tiene, por ej., 6, con preferencia 10 y con más preferencia 12 residuos de aminoácidos consecutivos.

La nectina-2 o su péptido parcial o sales del mismo se pueden fabricar por métodos conocidos públicamente o sus modificaciones que se usan para purificar proteínas de células o tejidos de seres humanos o animales de sangre caliente descritos anteriormente. De una manera alternativa, también se pueden fabricar mediante cultivos de transformantes que portan ADN que codifican estas proteínas y también se pueden fabricar de acuerdo con los métodos de síntesis de péptidos que se describen a continuación. Además, también se pueden fabricar por cultivos de transformantes que portan ADN que codifican una proteína de fusión de la proteína del dominio extracelular de nectina-2 y otra proteína o péptido.

(a) Cuando el antígeno de la presente invención o sus sales se preparan a partir de tejidos o células de seres humanos o animales de sangre caliente (por ej., cobayos, ratas, ratones, aves, conejos,

371

cerdos, ovejas, vacunos, monos, etc.), los tejidos o células se homogenizan y la fracción bruta (por ej., su fracción de membrana o fracción soluble) se puede usar como un antígeno en su forma intacta. Alternativamente, el homogenato se extrae con un ácido, tensioactivo, un alcohol, etc. y el extracto luego se purifica y aísla por una combinación de salazón, diálisis, filtración por gel, técnicas cromatográficas tales como cromatografía en fase reversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

(b) Cuando la nectina-2 o proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2 y la otra proteína (péptido), o sales de los mismos se preparan mediante transformantes que portan ADN, el ADN se puede preparar por un método conocido públicamente [por ej., el método descrito en Molecular Cloning, (2ª Edición; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc.].

Para la clonación de los ADN que codifican completamente la nectina-2 o su péptido parcial (de aquí en adelante algunas veces mencionado simplemente como nectina-2 en la descripción de la clonación de ADN que codifican el mismo y su expresión), el ADN se puede amplificar por PCR mediante cebadores de ADN sintéticos que contienen una parte de la secuencia base que codifica la nectina-2, o el ADN insertado en un vector apropiado se puede seleccionar por hibridación con un fragmento de ADN marcado o ADN sintético que codifica una parte o la región entera de nectina-2. Un polinucleótido molde usado para PCR puede ser cualquiera siempre que contenga una secuencia base que codifique nectina-2. El polinucleótido también puede ser ADN genómico, genoteca de ADN genómico, ADNc derivado de las células o tejidos descritos anteriormente y un ADN sintético.

La hibridación se puede realizar por métodos conocidos públicamente o modificaciones de los mismos, por ejemplo por el

372

método descrito en Molecular Cloning, 2ª Edición (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc. Una genoteca disponible en el mercado también se puede usar de acuerdo con las instrucciones del protocolo del fabricante adjunto. Con más preferencia, la hibridación se puede realizar en condiciones de alta rigurosidad.

Las condiciones de alta rigurosidad son, por ejemplo, una concentración de sodio a aproximadamente 19 a 40 mM, con preferencia aproximadamente 19 a 20 mM a una temperatura de aproximadamente 50 a 70°C, con preferencia aproximadamente 60 a 65°C. En particular, las condiciones de hibridación más preferidas son una concentración de sodio a aproximadamente 19 mM a una temperatura de aproximadamente 65°C.

Más específicamente, se emplean (i) un ADN que comprende la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 2, etc. como el ADN que codifica la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (nectina-2α); y (ii) un ADN que comprende la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 4, etc. como el ADN que codifica la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ).

La sustitución de la secuencia base de ADN se puede realizar por métodos conocidos públicamente tal como el método de PCR ODA-LA, el método de dúplex con brechas, el métodos de Kunkel, etc., o su modificación, mediante PCR, un kit conocido públicamente disponible como Mutan™-super Express Km (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.) o Mutan™-K (TaKaRa Shuzo Co., Ltd.), etc.

El ADN clonado que codifica nectina-2 se puede usar como tal, dependiendo del proceso o, si se desea, después de la digestión con una enzima de restricción o después de la adición de un ligador al mismo. El ADN puede contener ATG como un codón

373

de iniciación de traducción en el extremo 5' del mismo y TAA, TGA o TAG como un codón de terminación de traducción en el extremo 3' del mismo. Estos codones de iniciación y terminación de traducción también se pueden agregar por medio de un adaptador de ADN sintético apropiado. Cuando el ADN que codifica la proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2 y la otra proteína (péptido) o su sal, el ADN que codifica el dominio extracelular de nectina-2 clonado o sintetizado por el mismo método descrito anteriormente se liga con un ADN que codifica la otra proteína (péptido) por métodos conocidos públicamente o sus modificaciones.

El vector de expresión para nectina-2 se puede fabricar, por ejemplo, por (a) escisión del fragmento de ADN deseado del ADN que codifica la nectina-2, y luego (b) ligamiento del fragmento de ADN con un vector de expresión corriente abajo del promotor del vector.

Los ejemplos de vector incluyen plásmidos derivados de E. coli (por ej., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), plásmidos derivados de Bacillus subtilis (por ej., pUB110, pTP5, pC194), plásmidos derivados de levaduras (por ej., pSH19, pSH15), bacteriófagos tal como fago λ, etc., virus de animales tales como retrovirus, virus de vaccinia, virus de insectos, tales como baculovirus, etc. además de pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pADNc I/Neo, etc.

El promotor usado en la presente invención puede ser cualquier promotor si éste se aparea bien con un huésped usado para la expresión génica. En caso de usar células animales como huésped, los ejemplos del promotor incluyen al promotor SRα, promotor SV40, promotor LTR, promotor CMV, promotor HSV-TK, etc.

Entre ellos, se prefiere usar el promotor CMV

374

(citomegalovirus), promotor SRα, etc. Cuando el huésped es una bacteria del género Escherichia, los ejemplos preferidos del promotor incluyen al promotor trp, promotor lac, promotor recA, promotor λP_L, promotor lpp, promotor T7, etc. En el caso de usar bacterias del género Bacillus como huésped, los ejemplos preferidos del promotor son el promotor SPO1, promotor SPO2, promotor penP, etc. Cuando se usan levaduras como huésped, los ejemplos preferidos del promotor son el promotor PHO5, promotor PGK, promotor GAP, promotor ADH, etc. Cuando se usan las células de insecto como huésped, los ejemplos preferidos del promotor incluyen el promotor polihedrina, promotor P10, etc.

Además de los ejemplos precedentes, el vector de expresión también opcionalmente puede contener un potenciador, una señal de empalme, un señal de adición de poli-A, un marcador selectivo, origen de replicación SV40 (de aquí en adelante algunas veces abreviado como SV40ori), etc. Los ejemplos de marcadores de selección incluyen al gen de dihidrofolato reductasa (de aquí en adelante algunas veces abreviado dhfr) [resistencia a metotrexato (MTX)], gen resistente a ampicilina (de aquí en adelante algunas veces abreviado como Amp^r), gen resistente a neomicina (de aquí en adelante algunas veces abreviado Neo^r, resistencia a G418), etc. En particular, cuando el gen de dhfr se usa como marcador de selección empleando células de hámster chino deficientes en gen dhfr, la selección también se puede realizar en un medio libre de timidina.

Si es necesario, una señal de secuencia que se aparea a un huésped se agrega al lateral N-terminal de nectina-2. Los ejemplos de la secuencia señal que se pueden usar son la secuencia señal PhoA, secuencia señal OmpA, etc., cuando el huésped es una bacteria del género Escherichia; secuencia señal de α-amilasa, secuencia señal de subtilisina, etc., cuando el huésped es una

bacteria del género Bacillus; secuencia señal MFα, secuencia señal SUC2, etc., cuando el huésped es una levadura, secuencia señal de insulina, secuencia señal de α-interferón, secuencia señal de la molécula de anticuerpo etc., cuando el huésped es una célula de animal, respectivamente.

Los transformantes se pueden fabricar mediante el vector que contiene el ADN que codifica la nectina-2 construida de este modo.

Los ejemplos del huésped que se puede emplear son las bacterias que pertenecen al género Escherichia, bacteria que pertenecen al género Bacillus, levaduras, células de insectos, células de animales, etc.

Los ejemplos específicos de bacterias que pertenecen al género Escherichia incluyen a Escherichia coli K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], etc.

Los ejemplos de bacterias que pertenecen al género Bacillus incluyen a Bacillus subtilis MI114 [Gene, 24, 255 (1983)], 207-21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)], etc.

Los ejemplos de levaduras incluyen Saccharomyces cereviseae AH22, AH22R$^-$, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, Schizosaccharomyces pombe NCYC1913, NCYC2036, Pichia pastoris KM71, etc.

Los ejemplos de células de insectos incluyen, para el virus AcNPV, célula de Spodoptera frugiperda (célula Sf), célula MG1 derivada del intestino medio de Trichoplusia ni, célula High Five™ derivada de huevo de Trichoplusia ni, células derivadas de Mamestra brassicae, células derivadas de Estigmena acrea, etc.; y para el virus BmNPV, se usa la célula de Bombyx mori N I (célula BmN), etc. Los ejemplos de la célula Sf que se pueden usar son la

376

célula Sf9 (ATCC CRL1711), célula Sf21 (ambas células se describen en Vaughn, J. L. et al., In Vivo, 13, 213-217 (1977)), etc.

Como insecto, por ejemplo, se puede usar la larva de Bombyx mori [Maeda et al., Nature, 315, 592 (1985)].

Los ejemplos de células animales incluyen célula de simio COS-7, Vero, célula de hámster chino CHO (de aquí en adelante denominada célula CHO), célula de hámster chino CHO deficiente en el gen de dhfr (de aquí en adelante mencionada simplemente como células CHO ($dhfr^-$)), célula L de ratón, AtT-20 de ratón, célula de mieloma de ratón, célula ATDC5 de ratón, célula NS0 de ratón, célula FM3A de ratón, célula GH3 de rata, célula FL humana, célula embrionaria HEK293 humana, célula embrionaria 293F humana, etc.

Las bacterias pertenecientes al género Escherichia se pueden transformar, por ejemplo, por el método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972), Gene, 17, 107 (1982), etc.

Las bacterias pertenecientes al género Bacillus se pueden transformar, por ejemplo, por el método descrito en Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979), etc.

Las levaduras se pueden transformar, por ejemplo, por el método descrito en Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1929 (1978), etc.

Las células de insectos o insectos se pueden transformar, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en Bio/Technology, 6, 47-55(1988), etc.

Las células de animales se pueden transformar, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en Saibo Kogaku (Cell Engineering), edición extra 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263-267 (1995) (publicado por Shujunsha), o Virology, 52, 456 (1973).

De este modo, se pueden obtener los transformantes

377

transformados con los vectores de expresión que portan los ADN que codifican nectina-2.

Cuando el huésped es una bacteria que pertenece al género Escherichia o el género Bacillus, el transformante se puede cultivar apropiadamente en un medio líquido que contiene materiales requeridos para el crecimiento del transformante tal como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, materiales inorgánicos, y similares. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen glucosa, dextrina, almidón soluble, sacarosa, etc.; los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen materiales inorgánicos u orgánicos tales como sales de amonio, sales de nitrato, licor de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soya, extracto de papa, etc.; y, los ejemplos de los materiales inorgánicos son cloruro de calcio, difosfato ácido de sodio, cloruro de magnesio, etc. Además, los extractos de levadura, vitaminas, factores de promoción de crecimiento, etc. también se pueden agregar al medio. Con preferencia, el pH del medio se ajusta de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Un ejemplo preferido del medio para cultivar las bacterias pertenecientes al género Escherichia es el medio M9 suplementado con glucosa y ácidos de Casamino [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1972]. Si es necesario, se puede agregar un producto químico tal como ácido 3β-indolilacrílico al medio, de este modo se activa el promotor de forma eficiente.

Cuando el huésped es una bacteria que pertenece al género Escherichia, el transformante usualmente se cultiva a aproximadamente 15 a 43°C durante aproximadamente 3 a 24 horas. Si es necesario, el cultivo se puede airear o agitar.

Cuando el huésped es una bacteria que pertenece al género Bacillus, el transformante generalmente se cultiva a

aproximadamente 30 a 40°C durante aproximadamente 6 a 24 horas. Si es necesario, el cultivo se puede airear o agitar.

Cuando el huésped es una levadura, el transformante se cultiva, por ejemplo, en un medio mínimo de Burkholder [Bostian, K. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4505 (1980)] o en un medio SD suplementado con 0.5% de ácidos de Casamino [Bitter, G. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5330 (1984)]. Con preferencia, el pH del medio se ajusta a aproximadamente 5 a 8. En general, el transformante se cultiva a aproximadamente 20 a 35°C durante aproximadamente 24 a 72 horas. Si es necesario, el cultivo se puede airear o agitar.

Cuando el huésped es una célula de insecto o un insecto, el transformante se cultiva, por ejemplo, en un medio de insectos de Grace (Nature, 195, 788 (1962)) al cual se agrega un aditivo apropiado tal como suero bovino inactivado por calor al 10%. Con preferencia, el pH del medio se ajusta a aproximadamente 6.2 a aproximadamente 6.4. Normalmente, el transformante se cultiva a aproximadamente 27°C durante aproximadamente 3 días a aproximadamente 5 días, si es necesario, el cultivo se puede airear o agitar.

Cuando el huésped es una célula de animal, el transformante se cultiva, por ejemplo, en un medio MEM [Science, 122, 501 (1952)], medio DMEM [Virology, 8, 396 (1959)], medio RPMI 1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], etc., que contiene aproximadamente 5 a 20% de suero fetal bovino. Con preferencia, el pH del medio se ajusta a aproximadamente 6 a aproximadamente 8. El transformante usualmente se cultiva a aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 15 a 60 horas y, si es necesario, el cultivo se puede airear o agitar.

379

Como se describió anteriormente, la nectina-2 se puede producir en el transformante, en la membrana celular del transformante, o fuera del transformante.

La nectina-2 se puede separar y purificar a partir del cultivo descrito anteriormente por los siguientes procedimientos.

Cuando la nectina 2 se extrae de las bacterias o las células, las bacterias o células se recogen después de cultivar por métodos conocidos públicamente y suspenden en un regulador apropiado. Las bacterias o las células luego se alteran por métodos conocidos públicamente tal como tratamiento con ultrasonido, un tratamiento con lisozima y/o ciclo de descongelamiento/congelamiento, seguido de centrifugación, filtración, etc., para producir un extracto bruto de la proteína. El regulador usado para los procedimientos puede contener un modificador de proteína tal como urea o clorhidrato de guanidina o un tensioactivo tal como Triton X-100™, etc. Cuando la nectina-2 se secreta en el caldo de cultivo, el sobrenadante se puede separar, después de la finalización del cultivo, de las bacterias o células para recoger el sobrenadante por métodos conocidos públicamente.

La nectina-2 contenida en el sobrenadante o el extracto así obtenido se puede purificar por la combinación en forma apropiada de métodos conocidos públicamente para la separación y purificación. Tales métodos conocidos públicamente para la separación y purificación incluyen un método que utiliza la diferencia de solubilidad tal como salazón, precipitación de solventes, etc.; un métodos que utiliza principalmente la diferencia de peso molecular tal como diálisis, ultrafiltración, filtración por gel, etc.; un método que utiliza la diferencia de carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico, etc.; un método que utiliza la diferencia de afinidad específica tal como cromatografía de afinidad, etc.; un método que utiliza la diferencia de

hidrofobicidad tal como cromatografía en fase reversa etc.; un método que utiliza la diferencia en el punto isoeléctrico tal como isoelectroenfoque y similares.

Cuando la nectina-2 se obtiene de este modo en forma libre, la nectina-2 se puede convertir en su sal por métodos conocidos públicamente o modificaciones de los mismos. Por el contrario, cuando la nectina-2 se obtiene en forma de sal, se puede convertir en su forma libre o en la forma de una sal diferente por los métodos conocidos públicamente o modificaciones de los mismos.

La nectina-2 producida por el método recombinante se puede tratar antes o después de la purificación, con una enzima modificadora de la proteína apropiada de modo que la nectina-2 opcionalmente se pueda modificar o el polipéptido se pueda eliminar parcialmente. Los ejemplos, de la enzima modificadora de la proteína incluye tripsina, quimiotripsina, arginil-endopeptidasa, cinasa de proteína, glicosidasa, y similares.

La presencia de la nectina-2 producida de este modo se puede determinar por un inmunoensayo enzimático, transferencia western mediante un anticuerpo específico, etc.

(c) Las células de mamífero que expresan nectina-2 también se pueden usar directamente como el antígeno de la presente invención. Como células de mamífero, se pueden usar las células naturales como las descritas en (a) anteriormente, células transformadas por los métodos descritos en (b) anteriormente, etc. Los huéspedes usados para la transformación pueden ser cualquiera de las células en la medida que estas sean células recogidas de seres humanos, simios, rata, ratón, hámster, etc. y con preferencia se usan HEK293, COS7, CHO-K1, NIH3T3, Balb3T3, FM3A, L929, SP2/0, P3U1, NS0, B16, P388, o similares.

(d) El péptido (sintético) que tiene uno o más determinantes antigénicos, que son iguales a nectina-2, o su sal, se puede

381

fabricar por los métodos conocidos públicamente para síntesis de péptidos o por la ruptura de nectina-2 con una peptidasa apropiada. Para los métodos de la síntesis de péptidos, por ejemplo, se puede usar tanto la síntesis en fase sólida como la síntesis en fase líquida. Es decir, el péptido parcial o los aminoácidos que pueden construir el péptido se condensan con la parte restante. Cuando el producto contiene grupos protectores, estos grupos protectores se eliminan para dar el producto deseado. Los métodos conocidos públicamente para la condensación y eliminación de los grupos protectores se describen en (i) a (v) a continuación.

(i) M. Bodanszky & M.A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York (1966)

(ii) Schroeder & Luebke: The Peptide, Academic Press, Nueva York (1965)

(iii) Nobuo Izumiya, et al.: *Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken* (Basics and experiments of peptide synthesis), publicado por by Maruzen Co. (1975)

(iv) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: *Seikagaku Jikken Koza* (Biochemical Experiment) 1, *Tanpakushitsu no Kagaku* (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

(v) Haruaki Yajima, ed.: *Zoku Iyakuhin no Kaihatsu* (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, publicado por Hirokawa Shoten.

Después de finalizar la reacción, el péptido parcial usado en la presente invención se puede purificar y aislar por una combinación de métodos de purificación convencional tal como extracción de solventes, destilación, cromatografía en columna, cromatografía líquida y recristalización. Cuando el péptido parcial obtenido por los métodos anteriores está en forma libre, el péptido parcial se puede convertir en una sal apropiada por un método

382

conocido públicamente o su modificación; a la inversa cuando el péptido parcial se obtiene en un forma de sal, se puede convertir en una forma libre u otra forma de sal diferente por un método conocido públicamente o su modificación.

(2) Producción del anticuerpo monoclonal

(a) Establecimiento de las células productoras del anticuerpo monoclonal por el método del hibridoma

El antígeno de la presente invención se administra a animales de sangre caliente. La inmunización se puede realizar por cualquier método siempre que pueda estimular la producción del anticuerpo y con preferencia se usa la inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección en la planta de la pata, etc.

Las células de mamíferos naturales o las células de mamíferos transformadas, que expresan la proteína de la presente invención, se pueden inyectar para inmunizar a un animal como una suspensión de las células en un medio usado para cultivo de tejido (por ej., RPMI 1640) o regulador (por ej., solución salina de Hanks equilibrada).

El antígeno de la presente invención se puede proporcionar para la inmunización directa en su forma inmovilizada. El antígeno de la presente invención también puede estar unido o adsorbido a un portador apropiado y el complejo producido se pude proporcionar para la inmunización. Una proporción de mezcla del transportador al antígeno de la presente invención (hapteno) puede ser una proporción de cualquier tipo, siempre que el anticuerpo se pueda producir en forma eficiente del antígeno de la presente invención, el cual está unido o adsorbido al transportador. Un transportador natural o sintético de alto peso molecular convencionalmente usado para producir un anticuerpo contra un hapteno se puede usar en una proporción de peso de 0.1 a 100

383

contra 1 de hapteno. Los ejemplos del transportador de alto peso molecular natural que se pueden usar son albúmina sérica tal como bovina, de conejo, humana, etc., tiroglobulinas de mamíferos tal como bovina, de conejo, etc., hemoglobinas de mamíferos tal como bovina, de conejo, humana, ovejas, etc., o hemocianina de lapa californiana KHL. Los ejemplos de transportador de alto peso molecular sintético, que se puede usar son diversos látex que incluye a polímeros, copolímeros, etc., tales como, por ejemplo, poliaminoácidos, poliestirenos, poliacrilos, polivinilos, polipropilenos, etc.

Para el acoplamiento del hapteno y el transportador, se pueden usar una variedad de agentes de condensación. Los ejemplos de agentes de condensación, que se emplean en forma ventajosa, son compuestos de diazonio tales como bencidina bis-diazotizada capaz de entrecruzar tirosinas, histidinas o triptófanos; compuestos dialdehídicos tales como glutaraldehído y compuestos de diisocianato tales como toluen-2,4-diisocianato, etc. capaces de entrecruzar grupos amino entre sí; compuestos de dimaleimida tales como N,N'-o-fenilendimaleimida, etc. capaces de entrecruzar tioles entre sí; ésteres activados de maleimida capaces de entrecruzar un grupo amino con un grupo tiol; compuestos de carbodiimida capaces de entrecruzar un grupo amino con un grupo carboxilo; etc. En el entrecruzamiento de grupos amino entre sí, un grupo tiol se introduce en un grupo amino por reacción con un reactivo éster activado (por ej., 3-(2-ditiopiridil)-propionato de N-succinimidilo (SPDP), etc.) que tiene un grupo ditiopiridilo, seguido de reducción, mientras que el grupo maleimida se introduce en otro grupo amino mediante un reactivo éster activado de maleimida y los dos grupos pueden reaccionar entre sí.

Cuando el antígeno de la presente invención se administra, con el fin de potenciar la productividad del anticuerpo de un animal

inmunizado, el antígeno de la presente invención se puede mezclar con un adyuvante tal como adyuvante de Freund completo o adyuvante de Freund incompleto, Alum, un adyuvante de Ribi, etc. y la mezcla o emulsión resultante se pueden administrar al animal. La administración se realiza usualmente una vez cada aproximadamente 2 a 6 semanas y aproximadamente 2 a 10 veces en total. Además para producir el anticuerpo monoclonal de la presente invención, se puede usar la inmunización con ADN (ver, por ej., Nature, 356, 152-154). Los ejemplos de animales de sangre caliente aplicables son monos, conejos, perros, cobayos, ratones, ratas, hámsteres, ovejas, cabras, camellos, llamas y aves; se prefiere el uso de ratones y ratas para producir el anticuerpo monoclonal. Estos animales de sangre caliente pueden ser animales salvajes o con eliminación genética (KO), en donde los genes ortólogos del animal de sangre caliente de las proteínas del antígeno se eliminan genéticamente para lograr una respuesta inmune más potente contra el antígeno. También, se pueden usar animales transgénicos donde los genes del anticuerpo de los animales de sangre caliente se eliminan genéticamente, y se introducen los genes del anticuerpo humano (ver EP0546073), para dar los animales con introducción genética (WO 02/098217, WO 03/020743), etc. con el fin de producir los anticuerpos monoclonales humanos.

Para la preparación de células productoras de anticuerpos monoclonales, un animal de sangre caliente, por ej., un ratón, donde la titulación de anticuerpos se selecciona de animales inmunizados con el antígeno, luego se recoge el bazo o ganglio linfático después de 2 a 5 días después de la inmunización final. Las células B productoras de anticuerpos contenidas en el mismo están fusionadas con las células de mieloma derivadas de la misma o diferente especie, por medio del cual se establecen los

385.

hibridomas que producen el anticuerpo monoclonal. La titulación del anticuerpo en los antisueros se puede determinar por cualquier método, mientras que la cantidad de anticuerpo que se une específicamente al antígeno se puede cuantificar. Tal como se describirá posteriormente, se puede determinar la titulación del anticuerpo, por ejemplo, por la reacción de un antígeno proteico inmovilizado o línea celular que expresa el antígeno con el antisuero y luego se mide el nivel del anticuerpo unido a ellos mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado. La fusión se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos, por ej., by Koehler y Milstein [Nature, 256, 495 (1975)]. Los ejemplos del acelerador de fusión son polietilenglicol (PEG), virus de Sendai, etc., y se emplea con preferencia PEG.

Los ejemplos de células del mieloma son las que se recogen de animales de sangre caliente tales como NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1, etc. En particular, se emplean con preferencia SP2/0 y P3U1. Una proporción preferida del número de las células productoras de anticuerpos usadas (células de bazo) al número de las células de mieloma está dentro del rango de aproximadamente 1:1 a 20:1. Cuando se agrega PEG (con preferencia, PEG 1000 a PEG 6000) en una concentración de aproximadamente 10 a 80% seguida por la incubación a 20 a 40°C, con preferencia a 30 a 37°C durante 1 a 10 minutos, se puede llevar a cabo una fusión celular eficiente.

En las operaciones de fusión celular para establecer las células productoras de anticuerpo monoclonal, también se puede emplear electrofusión.

La selección de hibridomas se puede realizar por métodos conocidos públicamente o sus modificaciones. La selección de hibridomas se puede realizar normalmente en un medio para células animales suplementadas en forma normal con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Como medio de selección y

386

crecimiento, se puede emplear cualquier medio en la medida que el hibridoma pueda crecer allí. Por ejemplo, se puede usar el medio RPMI 1640 que contiene 1 a 20%, con preferencia 10 a 20% de suero fetal bovino, medio GIT (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contiene 1 a 10% de suero fetal bovino, un medio libre de suero para el cultivo de un hibridoma (SFM-101, Nissui Seiyaku Co., Ltd.) y similares para el medio de selección y crecimiento. El cultivo se realiza generalmente a una temperatura de 20 a 40°C, con preferencia a 37°C, durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 3 semanas, con preferencia 1 a 2 semanas. El cultivo se puede realizar normalmente en 5% de gas de dióxido de carbono.

Diversos métodos se pueden usar para la selección de los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de tales métodos incluyen un método que incluye la adición del sobrenadante de un hibridoma a una fase sólida (por ej., microplaca) adsorbida con un antígeno de proteína soluble o células que expresa el antígeno proteico, en forma directa o juntos con un transportador, seguido por la reacción con un anticuerpo anti-inmunoglobulina (por ejemplo, cuando las células del bazo usadas para la fusión celular son de ratón, se usa un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón) marcada con una sustancia radioactiva, una enzima, una sustancia fluorescente, etc., o con Proteína A, y detección del anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida; un método que incluye la adición del sobrenadante del hibridoma a una fase sólida adsorbida con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o Proteína A, seguido por la reacción con un antígeno proteico soluble marcado con una sustancia radioactiva, una enzima o una sustancia fluorescente, etc. y detección del anticuerpo monoclonal específico del antígeno unido a la fase sólida; etc. Cuando se usa la célula que expresa el antígeno

387

proteico, el sobrenadante del cultivo del hibridoma se agrega a la célula, seguido por la reacción con el anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con fluorescencia y se ensaya la intensidad de fluorescencia de la célula en un detector de fluorescencia tal como un citómetro de flujo, etc. De este modo, se puede detectar el anticuerpo monoclonal unido al antígeno proteico de la de la membrana celular.

(b) Producción del anticuerpo monoclonal por otros métodos.

El método para producir el anticuerpo de la presente invención no está limitada al método descrito en (a), pero por ejemplo, se puede usar una llamada tecnología de despliegue de anticuerpos, que incluye la presentación de una genoteca de anticuerpos que se preparado por métodos conocidos públicamente usando linfocitos B de seres humanos o animales de sangre caliente (por ej., mono, conejo, perro, cobayo, ratón, rata, hámster, oveja, cabra, camello, llama, ave, etc.) como material sobre la superficie celular del bacteriófago, Escherichia coli, levaduras, células animales, etc. o ribosomas [Nature Biotechnology 23, 1105 (2005)]. Los seres humanos o animales de sangre caliente pueden ser aquéllos que no han recibido tratamiento, pacientes cancerosos que portan cáncer con alta expresión del antígeno de la presente invención, o animales de sangre caliente que están inmunizados con el antígeno de la presente invención por el método descrito en (a). La forma de anticuerpos presentados en la superficie celular incluye pero sin limitación a moléculas de IgG, moléculas de IgM, fragmentos de Fab, fragmentos Fv (Fvsc) de cadena simple, etc.

El gen para el anticuerpo monoclonal (fragmento) capaz de unirse específicamente con el antígeno de la presente invención se puede obtener de las siguiente manera. La antes mencionada célula que presenta el fragmento o anticuerpo o ribosomas que presenta el anticuerpo(fragmento) que porta la genoteca del

anticuerpo se hace reaccionar con el antígeno de la presente invención durante un período de tiempo dado, seguido por la eliminación de las sustancias unidas en forma no específica por lavado. Después de eluir y recuperar el producto unido específicamente al antígeno de la presente invención, la célula que presenta anticuerpo (fragmento) o al ribosoma que presentan anticuerpo (fragmento) de deja crecer. El mismo procedimiento se repite varias veces y finalmente se puede aislar el gen deseado de la célula que presenta anticuerpo (fragmento) clonado o ribosoma que presentan el anticuerpo (fragmento) por métodos públicamente conocidos. El gen del fragmento del anticuerpo monoclonal obtenido de esta manera se recombina con dicha región del gen del anticuerpo IgG para adquirir el gen del anticuerpo IgG del anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo de la presente invención también se puede obtener por la inmunización de células productoras de anticuerpos aisladas de seres humanos o animales de sangre caliente descritas anteriormente con el antígeno de la presente invención in vitro por métodos conocidos públicamente y luego el establecimiento de hibridomas como el método descrito en (a).

(c) Fabricación de anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede fabricar por el cultivo del hibridoma productor de anticuerpo monoclonal obtenido en (a), la línea celular recombinante en la cual el gen del anticuerpo se aísla del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal obtenido en (a) por métodos públicamente conocidos o el gen del anticuerpo monoclonal obtenido en (b) está expresado en forma artificial. El anticuerpo monoclonal también se puede fabricar por la incorporación del gen del anticuerpo en un cromosoma de animales de sangre caliente o planta por métodos conocidos públicamente y que producen el anticuerpo monoclonal

389

en sangre, leche y huevos de animales de sangre caliente, cuerpo de planta, hongo, etc. [Curr. Opin. Biotechnol., 7, 536 (1996), Nature Rev. Genet., 4, 794 (2003), Appl. Environ. Microbiol., 70, 2567 (2004)]. Los ejemplos de animales de sangre caliente usados con bovinos, cabra, oveja, cerdo, aves, ratón, conejo, etc. Los ejemplos de cuerpos de planta son tabaco, maíz dulce, papa, lemna, etc.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede purificar a partir de las materias primas descritas anteriormente que contienen el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, por métodos conocidos públicamente para separación y purificación de inmunoglobulinas [por ej., salazón, precipitación con alcohol, precipitación isoeléctrica, varias cromatografías tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en fase reversa, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía de afinidad en la cual solo se puede separar y purificar el anticuerpo con un transportador con el cual la sustancia tiene afinidad con el anticuerpo tal como antígeno o proteína A, proteína G, está inmovilizada, etc.], y similares.

(3) Medicamento que comprende el anticuerpo de la presente invención

El anticuerpo de la presente invención descrita anteriormente se puede usar como un medicamento tal como un agente, por ejemplo, para prevenir/tratar cáncer (por ej., cáncer de colon, cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer hepático, carcinoma de vías biliares, cáncer del bazo, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer tiroideo, cáncer pancreático, tumor de cerebro, tumor sanguíneo, etc.) (con preferencia, un agente para prevenir/tratar el cáncer de mamas,

390

cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer ovárico , cáncer pancreático, etc.), un inductor de apoptosis de las células cancerosas, un inhibidor de crecimiento de las células cancerosas, un inductor de cambio del ciclo celular en una célula cancerosa, un agente para suprimir la metástasis del cáncer, un inhibidor de la adhesión de la célula cancerosa, un agente citotóxico contra las células cancerosas que usa un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo, un agente citotóxico dependiente del anticuerpo de las células cancerosas, etc. Como método para dañar las células cancerosas mediante un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo, se dan la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC) por células efectoras en el cuerpo vivo y citotoxicidad mediada por complemento (CDC), y con preferencia se usa ADCC.

El medicamento que comprende el anticuerpo de la presente invención es de baja toxicidad y se puede administrar por vía oral o parenteral (por ej., administración intravascular, administración subcutánea, etc.) a los seres humanos o mamíferos (por ej., ratas, conejos, ovejas, cerdos, bovinos, gatos, perros, monos, etc.) tanto en forma de preparación líquida o como una composición farmacéutica de la forma de dosis apropiada.

El anticuerpo de la presente invención se puede administrar por sí misma o se puede administrar como una composición farmacéutica apropiada. La composición farmacéutica usada para la administración puede contener el anticuerpo de la presente invención o sus sales, un vehículo, un diluyente o excipiente aceptable para uso farmacológico. Tal composición farmacéutica se proporciona en forma de dosificación adecuada para la administración oral o parenteral.

Los ejemplos de la composición para administración

parenteral son preparaciones inyectables, supositorios, etc. Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación tales como inyecciones intravenosa, subcutánea, intracutánea e intramuscular, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar por métodos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar por disolución, suspensión o emulsión del anticuerpo de la presente invención o su sal en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente usado para inyecciones. Como medio acuoso para las inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., los cuales se pueden usar en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ej., etanol), un polialcohol (por ej., propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ej., polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, por ejemplo se hallan por ej., aceite de ajonjolí, aceite de soya, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La preparación inyectable así preparada se coloca usualmente en una ampolleta apropiada. El supositorio usado para la administración rectal se puede preparar por la combinación del anticuerpo de la presente invención o su sal con bases convencionales para supositorios.

La composición para administración oral incluye preparaciones sólidas o líquidas, específicamente, comprimidos (que incluyen grageas y comprimidos recubiertos con película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (que incluye a las cápsulas blandas), jarabe, emulsiones, suspensiones, etc. Tal composición se fabrica por métodos conocidos públicamente y puede contener un vehículo, un diluyente o excipiente usado

392

convencionalmente en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Los ejemplos de vehículo o excipiente para los comprimidos son lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio, etc.

En forma favorable, las composiciones farmacéuticas para usos oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en preparaciones farmacéuticas con una dosis unitaria adecuada para la dosis de los componentes activos. Tales preparaciones de dosis unitaria incluye, por ejemplo, comprimidos, pastillas, cápsulas, inyecciones (ampolletas), supositorios, etc. La cantidad del compuesto mencionado anteriormente contenida es de generalmente 5 a 500 mg por forma de unidad de dosis, se prefiere que el anticuerpo descrito anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg especialmente en forma e inyección y en 10 a 250 mg para las otras formas.

La dosis del agente o regulador preventivo/terapéutico anteriormente mencionado que comprende el anticuerpo de la presente invención puede ser favorablemente una administración por vía intravenosa de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, con preferencia aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal y con más preferencia aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, por administración como el anticuerpo de la presente invención aproximadamente 1 a 5 veces/día, con preferencia aproximadamente 1 a 3 veces/día, por ejemplo, cuando se usa para tratar/prevenir el cáncer de mamas en adulto, si bien la dosis puede variar de acuerdo con el sujeto al que se administra, enfermedad blanco, condiciones, vía de administración, etc. También en otra administración parenteral y oral, el agente se puede administrar en una dosis correspondiente a la dosis dada anteriormente. Cuando la afección es especialmente grave, la dosis

393

se puede aumentar de acuerdo con la afección.

El anticuerpo de la presente invención se puede administrar como se encuentra o en forma de una composición farmacéutica apropiada. La composición farmacéutica usada para la administración mencionada anteriormente contiene el anticuerpo mencionado anteriormente o sus sales, un vehículo y un diluyente o excipiente aceptable para uso fisiológico. Tal composición se proporciona en la forma de dosificación adecuada para la administración oral o parenteral (por ej., inyección intravascular, inyección subcutánea, etc.).

Cada composición descrita anteriormente puede contener otros componentes activos adicionales a menos que la formulación cause alguna interacción adversa para la composición del anticuerpo descrito anteriormente.

Además, el anticuerpo de la presente invención se puede usar en combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes alquilantes (por ej., ciclofosfamida, ifosfamida, etc.), antagonistas metabólicos (por ej., metotrexato, 5-fluorouracilo, etc.), anticuerpos antitumorales (por ej., mitomicina, adriamicina, etc.), agentes antitumorales derivados de planta (por ej., vincristina, vindesina, Taxol, etc.), cisplatina, carboplatina, etoposida, irinotecano, etc. El anticuerpo de la presente invención y los fármacos descritos anteriormente se pueden administrar al paciente en forma simultánea o en tiempos escalonados.

(4) Cuantificación de nectina-2 mediante el anticuerpo de la presente invención

El anticuerpo de la presente invención es capaz de reconocer específicamente nectina-2 y en consecuencia se puede usar para la cuantificación de nectina-2 en un fluido de muestra de ensayo, en particular, para la cuantificación por un inmunoensayo de emparedado, etc.

394

Es decir, la presente invención proporciona:

(i) un método para cuantificar nectina-2 en un fluido de muestra de ensayo, la cual se caracteriza por la reacción competitiva del anticuerpo de la presente invención, un fluido de muestra de ensayo y una nectina-2 marcada y la medición de la proporción de nectina-2 marcada que se une a dicho anticuerpo;

(ii) un método para cuantificar nectina-2 en un fluido de muestra de ensayo, la cual se caracteriza por la reacción de un fluido de muestra de ensayo en forma simultánea o secuencial con el anticuerpo de la presente invención inmovilizado en un transportador y otro anticuerpo marcado de la presente invención y luego la medición de de la actividad del agente marcado en el transportador insoluble; y,

(iii) un método para cuantificar nectina-2 en un fluido de muestra de ensayo, la cual se caracteriza por la reacción de un fluido de muestra de ensayo con el anticuerpo de la presente invención inmovilizado en el transportador y luego la medición del cambio cuantitativo de nectina-2 unida a un transportador o insoluble por ej., por un método de detección tal como resonancia del plasmón superficial (SPR) etc.

En el método de cuantificación (ii) descrito anteriormente, se usa con preferencia un anticuerpo que tiene sitios de unión diferentes a nectina-2.

El anticuerpo de la presente invención se puede usar no solo para la cuantificación de nectina-2 sino también para la detección de nectina-2 por medio de la tinción del tejido, etc. Para estos propósitos, también se pueden usar la molécula del anticuerpo per se y las fracciones F $(ab')_2$, Fab' o Fab de la molécula del anticuerpo.

El método de cuantificación de nectina-2 que usa el anticuerpo de la presente invención no está particularmente

limitado. Cualquier método de cuantificación se puede usar, siempre que el nivel de un anticuerpo, antígeno o complejo antígeno-anticuerpo correspondiente al nivel de antígeno (por ej., el nivel de proteína) en un líquido de muestra de ensayo se pueda detectar por medios físicos o químicos y el nivel del antígeno se puede calcular a partir de una curva estándar preparada con soluciones estándares que contienen niveles conocidos del antígeno. Para tal método de ensayo, se usan adecuadamente por ejemplo, la nefrometría, el método competitivo, el método inmunométrico, el método SPR, el método de emparedado etc. Sin embargo, es particularmente preferido del método de emparedado en términos de sensibilidad y especificidad que se describe posteriormente.

Los ejemplos de agentes marcados, que se emplean para los métodos de ensayo que usan agentes marcados, son radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminescentes, etc. Los ejemplos de radioisótopos incluyen a [^{125}I], [^{131}I], [^{3}H], [^{14}C], etc. Los ejemplos preferidos de las enzimas son las que son estables y tienen una actividad especifica superior, que incluyen a por ej., β-galactosidasa β-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa, malato deshidrogenasa, etc. Los ejemplos de las sustancias fluorescentes incluyen por ej., colorantes fluorescentes de cianamina (por ej., Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 (fabricados por Amersham Biosciences), etc.), fluorescamina, isotiocianato de fluoresceína, colorante Alexa Fluor (Invitrogen), complejo de fluorescencia de europio (Perkin Elmer), etc. Los ejemplos de sustancias luminescentes son por ej., luminol, un derivado de luminol, luciferina, lucigenina, etc. Además, un sistema de biotina-avidina se puede usar además por la combinación de un anticuerpo o antígeno con un agente de marcación.

Para la inmovilización del antígeno o anticuerpo, se puede

usar adsorción física y un método que usa la unión química, el cual se usa convencionalmente para la insolubilización o inmovilización de las proteínas, enzimas, etc. Para inmovilizar el antígeno o anticuerpo, estas proteínas que se pueden marcar con biotina, la cual se pueden unir a un transportador sobre el cual se inmoviliza previamente la estreptavidina. La inmovilización del anticuerpo se puede realizar por la captura de éste en un transportador sobre el cual, la proteína A, proteína G, anticuerpo anti-inmunoglobulina, etc. está previamente inmovilizada. Como transportadores, se usan, por ej., polisacáridos insolubles tales como agarosa, dextrano, celulosa, etc.; resina sintética tal como poliestireno, poliacrilamida, silicona, etc., y vidrio o similares.

En el método de emparedado, el anticuerpo monoclonal inmovilizado de la presente invención se hace reaccionar con un líquido de muestra de ensayo (reacción primaria), luego con una forma marcada de otro anticuerpo monoclonal de la presente invención (reacción secundaria), y se mide la actividad de la marca en el transportador inmovilizado por medio del cual se puede cuantificar el nivel de la proteína de la presente invención en el líquido de muestra del ensayo. El orden de las reacciones primarias y secundarias se puede revertir y las reacciones se pueden realizar en forma simultánea o en tiempos escalonados. Los métodos de marca e inmovilización se pueden realizar por los métodos descritos anteriormente. En el inmunoensayo por el método de emparedado, el anticuerpo usado para los anticuerpos inmovilizados o marcados no es necesariamente una especie sino que se puede usar una mezcla de dos o más anticuerpos para aumentar la sensibilidad del ensayo.

En el ensayo para la nectina-2 de la presente invención por el método de emparedado, los anticuerpos usados en las reacciones primarias y secundarias son con preferencia anticuerpos que tienen

396

sitios de unión diferentes para nectina-2.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para los sistemas de ensayo diferentes que el método de emparedado, por ejemplo, el método competitivo, el método inmunométrico, método SPR, nefrometría, etc.

En el método competitivo, la cantidad de antígeno en el fluido de la muestra de ensayo se cuantifica por la reacción competitiva con el antígeno fluido de la muestra de ensayo y el antígeno marcado con el anticuerpo, separación del antígeno marcado sin reaccionar (F) y el antígeno marcado unido al anticuerpo (B) (separación B/F) seguido por la medición de la cantidad de la marca en B o F. Este método de reacción incluye un método de fase líquida usando un anticuerpo soluble como anticuerpo y polietilen glicol, un anticuerpo secundario contra el anticuerpo soluble, etc., para la separación de B/F y un método sólido que usa tanto un anticuerpo inmovilizado como un anticuerpo primario o que usa un anticuerpo soluble como anticuerpo primario y anticuerpo inmovilizado como anticuerpo secundario.

En el método inmunométrico, la cantidad del antígeno del fluido de la muestra de ensayo se cuantifica por la reacción competitiva del antígeno del fluido de la muestra de ensayo y el antígeno inmovilizado con una cantidad definida de anticuerpo marcado, seguido por la separación de la fase inmovilizada de la fase líquida o por reacción del antígeno del fluido de la muestra de ensayo y una cantidad en exceso del anticuerpo marcado, adición del antígeno inmovilizado para capturar el anticuerpo marcado sin reaccionar, seguido por la separación de la fase inmovilizada de la fase inmovilizada, los cuales son seguidos por la medición de la cantidad de marca en cualquiera de las fases.

En el método SPR, el anticuerpo está insolubilizado en la superficie de una película delgada de oro formada sobre un

sustrato de vidrio y un fluido de la muestra de ensayo se aplica sobre la película delgada. Un cambio de cantidad del analito de la proteína unido al anticuerpo de la película delgada se puede cuantificar mediante el principio de la resonancia del plasmón superficial (SPR) (Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 37, 2977-2984 (1992)).

Y en la nefrometría, se cuantifica el precipitado insoluble producido después de la reacción antígeno-anticuerpo en gel o solución. Cuando la cantidad de antígeno en el fluido de la muestra de ensayo es pequeña y sólo se obtiene una pequeña cantidad del precipitado, se emplea favorablemente la nefrometría láser que emplea dispersión del láser.

Para la aplicación de cada uno de estos ensayos inmunológicos como método de cuantificación de la presente invención, no se requiere establecer ninguna condición, procedimientos particulares, etc. Los sistemas de cuantificación para la nectina-2 se establecen mediante la adición de consideraciones técnicas convencionales en este campo, a las condiciones, procedimientos convencionales, etc. Para los detalles de estos medios técnicos generales, se puede hacer referencia a las siguientes revisiones y textos.

Por ejemplo, se puede referir a Hiroshi Irie, ed. "Radioimmunoassay" (Kodansha, publicado en 1974), Hiroshi Irie, ed. "Sequel to the Radioimmunoassay" (Kodansha, publicado en 1979), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Enzyme immunoassay" (Igakushoin, publicado en 1978), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Enzyme immunoassay" (2ª Edición) (Igakushoin, publicado en 1982), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Enzyme immunoassay" (3ª Edición) (Igakushoin, publicado en 1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Parte A)), ibid., Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Parte B)), ibid., Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Parte C)),

398

ibid., Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Parte D: Selected Immunoassays)), ibid., Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Parte E: Monoclonal Antibodies y General Immunoassay Methods)), ibid., Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Parte I: The hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (todos publicados por Academic Press Publishing), etc.

Como se describió anteriormente, la nectina-2 se puede cuantificar con alta sensibilidad usando el anticuerpo de la presente invención.

(5) Agente y método de diagnóstico mediante el anticuerpo de la presente invención

Además, cuando se detecta un nivel de nectina-2 aumentado por la cuantificación del nivel de nectina-2 usando el anticuerpo de la presente invención, se puede diagnosticar que se sufre de las enfermedades, por ejemplo, cáncer (por ej.,cáncer de colon, cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer de las vías biliares, cáncer del bazo, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer uterino, cáncer ovárico , cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, tumor sanguíneo, etc.) o similares, o es muy probable que se sufra de estas enfermedades en el futuro.

Además, el anticuerpo de la presente invención se puede usar para detectar nectina-2 presente en las muestras de ensayo tales como fluidos corporales, tejidos, etc. También se puede necesitar el anticuerpo para la preparación de columnas de anticuerpo usadas para purificar la nectina-2, para la detección de nectina-2 en cada fracción después de la purificación, para el análisis del comportamiento de la nectina-2 en las células de ensayo; etc.

(6) Anticuerpo utilizado en el agente de la invención para

399

prevenir/tratar cáncer de mama

Se puede utilizar un anticuerpo monoclonal (referido posteriormente en la presente como el anticuerpo utilizado en la presente invención) producido mediante las células de hibridoma mostradas por:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),

Nec1-244-3 (FERM BP-10423),

Nec1-530-1 (FERM BP-10424),

Nec1-903-1 (FERM BP-10425),

Nec1-520-1 (FERM BP-10426),

Nec1-845-2 (FERM BP-10427),

Nec1-834-1 (FERM BP-10428),

Nec1-964-1 (FERM BP-10683),

Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),

Nec1-554-1 (FERM BP-10681),

Nec1-769-2 (FERM BP-10682), o

Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

El anticuerpo utilizado en la presente invención incluye además anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpos) producidos por manipulación genética y que tienen secuencias de aminoácidos de CDR específicas o secuenciad de aminoácidos en la región variable de los anticuerpos producidos por estos hibridomas.

En los extremos N-terminales de las cadenas pesadas y livianas, existen regiones variables que se llaman región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena liviana (VL), respectivamente. En la región variable, existe una región determinante de complementariedad (CDR) y esta parte es responsable de la especificidad del reconocimiento de antígenos. Una parte de la región variable diferente de la CDR funciona para retener la estructura de CDR y se llama región de armazón (FR).

En los extremos C-terminales de las cadenas pesadas y livianas, existen regiones constantes que se llaman región constante de cadena pesada (CH) y región constante de cadena liviana (CL), respectivamente. En la región variable de cadena pesada, existen tres regiones determinantes de complementariedad: la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3). Las tres regiones determinantes de complementariedad de la región variable de cadena pesada se llaman colectivamente región determinante de complementariedad de cadena pesada. De igual manera, existen tres regiones determinantes de complementariedad en la región variable de cadena liviana, que son la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3). Estas tres regiones determinantes de complementariedad de la región variable de cadena liviana se llaman colectivamente región determinante de complementariedad de cadena liviana.

La secuencia de CDR (secuencia de aminoácidos y secuencia de bases) del anticuerpo utilizado en la presente invención se muestra en las siguientes TABLAS 21-24.

Las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por: (i) el número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) el número de identificación de

401

secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) el número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS:186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprenden la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por: (iv) el número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) el número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) el número de identificación de secuencia seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente.

En lo que respecta al anticuerpo usado en la presente invención, las secuencias de aminoácidos diferentes de las CDR no están particularmente limitadas pero el anticuerpo de la presente invención incluye el denominado anticuerpo injertado con CDR en el cual secuencias de aminoácidos distintas de CDR se derivan de otro anticuerpo, en especial de un anticuerpo de una especie diferente. Se prefieren secuencias de aminoácidos derivadas de humano como secuencias de aminoácidos diferentes de CDR y pueden estar acompañadas, de ser necesario, por la adición, supresión, sustitución y/o inserción de uno o más residuos de aminoácidos de la región de armazón (FR).

En lo que respecta al anticuerpo usado en la presente

invención, la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo de la presente invención son preferentemente aquellas dadas en la TABLA 25. El anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR específica o la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo utilizado en la presente invención pueden prepararse utilizando métodos conocidos.

(7) Anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con el anticuerpo de la presente invención utilizado como agente para prevenir/tratar el cáncer de mama:

El anticuerpo monoclonal que puede utilizarse incluye el anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por:

Nec1-803-2 (FERM BP-10417),

Nec1-244-3 (FERM BP-10423),

Nec1-530-1 (FERM BP-10424),

Nec1-903-1 (FERM BP-10425),

Nec1-520-1 (FERM BP-10426),

Nec1-845-2 (FERM BP-10427),

Nec1-834-1 (FERM BP-10428),

Nec1-964-1 (FERM BP-10683),

Nec1-1302-2 (FERM BP-10684),

Nec1-554-1 (FERM BP-10681),

Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o

Nec8-4116-8 (FERM BP-10685)

o el anticuerpo monoclonal, que se une a la nectina-2 en forma competitiva con los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) que tienen secuencias de aminoácidos de CDR específicas o secuencias de aminoácidos en la región variable de los anticuerpos producidos por estos hibridomas (de aquí en adelante también denominado anticuerpo que se une en forma

competitiva con el anticuerpo utilizado en la presente invención).

(7)-(i) Preparación del antígeno

Debido a que el antígeno utilizado para preparar el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva al antígeno con el anticuerpo utilizado en la presente invención, por ejemplo, una línea celular o su fracción de membrana, en donde cualquiera de los antígenos, tales como una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 (nectina-2), su péptido parcial, o sales del mismo, se expresa altamente de una manera natural o artificial, se puede utilizar una proteína de fusión de la proteína del dominio extracelular de nectina-2 y la otra proteína o péptido, o sales de los mismos; un péptido (sintético que tenga uno o más determinantes antigénicos, los cuales sean iguales a los de la nectina-2; un vector de expresión celular animal que comprenda a la secuencia de nucleótidos representada por las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o una parte de la secuencia de nucleótidos de las mismas, etc. (posteriormente en la presente estos antígenos son algunas veces meramente referidos como el antígeno utilizado en la presente invención).

Los ejemplos de la "otra proteína o péptido" para producir la proteína de fusión con dominio extracelular de nectina-2 incluyen FLAG-tag, His-tag, Myc-tag, V5-tag, GST-tag, S-tag, T7-tag, o las regiones Fc del anticuerpo humano, anticuerpo de ratón, etc., y así sucesivamente.

Aunque la longitud de un péptido que tenga el mismo determinante antigénico que la nectina-2 utilizada para producir un anticuerpo que se enlace de una manera competitiva a la nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención no está limitada, siempre que tenga una longitud tal que exhiba inmunogenicidad, el péptido incluye, por ejemplo, a péptido que

tenga, por ejemplo, 6, de preferencia 10, y de una manera muy preferible 12 residuos de aminoácidos consecutivos.

Un péptido que tenga la secuencia de cuando menos 20, de preferencia de cuando menos 50, más preferiblemente de cuando menos 70, todavía más preferiblemente de cuando menos 100, y de una manera muy preferible de cuando menos 200 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos constituyente de nectina-2, y similares, se utiliza como la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o su péptido parcial, que se utiliza para producir el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a la nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención.

También, el determinante antigénico del anticuerpo utilizado en la presente invención se describe en la Publicación Internacional del TCP Número PCT/JP2006/320429, basándose en la cual se presentó esta solicitud. La descripción de la Publicación Internacional del TCP Número PCT/JP2006/320429 también se incorpora a la presente invención como referencia.

La nectina-2 o sus péptidos parciales, o sales de los mismos, se pueden fabricar mediante los métodos públicamente conocidos o se pueden emplear sus modificaciones para purificar proteínas a partir de las células o tejidos de seres humanos o de animales de sangre caliente descritos anteriormente. De una manera alternativa, también se pueden fabricar mediante el cultivo de transformantes que lleven ADNs que codifiquen estas proteínas. Y también se pueden fabricar de acuerdo con una modificación de los métodos para la síntesis de péptidos descritos posteriormente. En adición, una proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2 y la otra proteína o péptido, también se puede fabricar mediante el cultivo de transformantes que lleven ADNs que codifiquen la proteína de fusión.

(7)-(ii) Producción del anticuerpo monoclonal

(a) Producción de células productoras del anticuerpo monoclonal mediante el método de hibridoma

El antígeno descrito en (2)-(i) se administra a animales de sangre caliente. La inmunización se puede hacer mediante cualquier método, siempre que pueda estimular la producción del anticuerpo, y de preferencia se utiliza la inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección de la planta de la pata, etc. El antígeno utilizado en la presente invención se puede utilizar directamente para la inmunización en su forma insolubilizada. De una manera alternativa, el antígeno se puede enlazar o adsorber a un vehículo apropiado, y se puede utilizar el conjugado resultante para la inmunización.

Cuando el antígeno utilizado en la presente invención se administra con el objeto de potenciar la productividad de anticuerpos de un animal inmunizado, el antígeno utilizado en la presente invención se puede mezclar con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund, alum, un adyuvante de Ribi, etc., y la mezcla o emulsión resultante se puede administrar al animal. Los ejemplos de los animales de sangre caliente utilizados son monos, conejos, perros, cobayos, ratones, ratas, hámsteres, ovejas, cabras, camellos, llamas, y aves de corral, prefiriéndose el uso de ratones y ratas. Estos animales de sangre caliente pueden ser animales con eliminación genética en donde se eliminen genéticamente las proteínas de genes de antígeno ortólogos del animal de sangre caliente para lograr una respuesta inmune más potente contra el antígeno. También, se pueden utilizar animales transgénicos en los que se eliminen genéticamente los genes de anticuerpo de los animales de sangre caliente, y se introduzcan genes de anticuerpos humanos (véase la

406.

Solicitud de Patente Europea Número EPA 0546073), animales con introducción genética (Publicaciones Internacionales Números WO 02/098217, WO 03/020743), etc., para producir anticuerpos monoclonales humanos.

En la producción de las células productoras de anticuerpos monoclonales, se selecciona un animal de sangre caliente, por ejemplo un ratón, en el que se observe la titulación del anticuerpo, a partir de los animales inmunizados con el antígeno, y luego se recolecta el bazo o el nodo linfático de 2 a 5 días después de la inmunización final. Las células-B productoras de anticuerpos contenidas en el mismo, se fusionan con células de mieloma derivadas a partir de la misma o diferente especie, mediante lo cual se pueden producir hibridomas productores del anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de las células de mieloma son aquéllas recolectadas a partir de animales de sangre caliente, tales como NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1, etc. En particular, se emplean de preferencia SP2/0 y P3U1. El rastreo de hibridomas se puede llevar a cabo mediante los métodos públicamente conocidos o sus modificaciones.

(b) Producción del anticuerpo monoclonal mediante otros métodos

El método para producir el anticuerpo no está limitado a los métodos descritos anteriormente, sino que se puede emplear la denominada como tecnología de exhibición de anticuerpos, la cual involucra la presentación de una biblioteca de genes de anticuerpos preparada mediante los métodos públicamente conocidos utilizando linfocitos-B, por ejemplo, de seres humanos o de animales de sangre caliente (por ejemplo, mono, conejo, perro, cobayo, ratón, rata, hámster, oveja, cabra, camello, llama, aves de corral, etc.) como un material sobre la superficie celular de bacteriófagos, *Escherichia coli*, levadura, células animales, etc., o sobre ribosomas [Nature Biotechnology: 23, 1105 (2005)]. Los

seres humanos o los animales de sangre caliente pueden ser puros, o pueden ser pacientes que porten el cáncer que sobre-exprese el antígeno utilizado en la presente invención, o animales de sangre caliente que estén inmunizados con el antígeno utilizado en la presente invención mediante el método descrito en (a). La forma de los anticuerpos presentados sobre la superficie celular incluye, pero no se limita a, moléculas de IgG, moléculas de IgM, fragmentos Fb, fragmentos Fv de una sola cadena (svFv), etc.

El gen para el anticuerpo monoclonal (fragmento) capaz de enlazarse específicamente al antígeno utilizado en la presente invención se puede producir como sigue. La célula presentadora de anticuerpo (fragmento) anteriormente mencionada, o el ribosoma presentador de anticuerpo (fragmento) que porte una biblioteca de genes de anticuerpos, se hace reaccionar con el antígeno utilizado en la presente invención durante un período de tiempo dado, seguido por la remoción de las sustancias no específicamente enlazadas mediante lavado. Después de eluir y recuperar el producto enlazado específicamente al antígeno utilizado en la presente invención, se permite que crezca la célula presentadora de anticuerpo (fragmento) o el ribosoma presentador de anticuerpo (fragmento). Se repite el mismo procedimiento varias veces, y finalmente se puede aislar el gen objetivo a partir de la célula presentadora de anticuerpo (fragmento) o el ribosoma presentador de anticuerpo (fragmento) clonados, mediante los métodos públicamente conocidos. El gen de fragmento de anticuerpo monoclonal así obtenido se recombina con la región mencionada del gen de anticuerpo de IgG mediante los métodos públicamente conocidos, para obtener el gen de anticuerpo de IgG del anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo monoclonal que comprenda sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos

408

de la región determinante de complementariedad específica o una secuencia de aminoácidos de región variable del anticuerpo utilizado en la presente invención, también se puede obtener mediante ingeniería genética.

En la presente, la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, que es sustancialmente la misma que una secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad específica o una secuencia de aminoácidos de región variable (posteriormente en la presente la secuencia de aminoácidos A) del anticuerpo monoclonal utilizado en la presente invención incluye las secuencias de aminoácidos que tengan una homología de cuando menos aproximadamente el 50 por ciento, de preferencia una homología de cuando menos aproximadamente el 60 por ciento, más preferiblemente una homología de cuando menos aproximadamente el 70 por ciento, todavía más preferiblemente una homología de cuando menos aproximadamente el 80 por ciento, mucho más preferiblemente una homología de cuando menos aproximadamente el 90 por ciento, y de una manera muy preferible una homología de cuando menos aproximadamente el 95 por ciento, con la secuencia de aminoácidos A; etc.

La homología de las secuencias de aminoácidos se puede medir utilizando un algoritmo de puntaje de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool), bajo las siguientes condiciones (un valor esperado = 10; se permiten brechas; matriz = BLOSUM62; filtración = OFF).

Los ejemplos de los anticuerpos monoclonales que comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos A incluyen los anticuerpos que contienen: (i) una secuencia de aminoácidos en donde se suprimen cuando menos 1 ó 2 (por ejemplo, de

409

aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y de una manera muy preferible varios (1 a 5)) aminoácidos de la secuencia de aminoácidos A; (ii) una secuencia de aminoácidos en donde se agregan cuando menos 1 ó 2 (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y de una manera muy preferible varios (1 a 5)) aminoácidos a la secuencia de aminoácidos A; (iii) una secuencia de aminoácidos en donde se insertan cuando menos 1 ó 2 (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y de una manera muy preferible varios (1 a 5)) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos A; (iv) una secuencia de aminoácidos en donde cuando menos 1 ó 2 (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y de una manera muy preferible varios (1 a 5)) aminoácidos de la secuencia de aminoácidos A son sustituidos por otros aminoácidos; o (v) una secuencia de aminoácidos que es una combinación de las mencionadas anteriormente; y similares.

El anticuerpo utilizado en la presente invención también se puede obtener mediante la inmunización de células productoras de anticuerpos aisladas a partir de seres humanos o de los animales de sangre caliente descritos anteriormente, con el antígeno utilizado en la presente invención *in vitro*, mediante los métodos públicamente conocidos, y luego se producen los hibridomas.

El anticuerpo monoclonal utilizado en la presente invención se puede fabricar mediante el cultivo del hibridoma productor de

410.

anticuerpo monoclonal obtenido en (a), y se aísla la línea celular recombinante en la que se aísla el gen de anticuerpo a partir del hibridoma productor de anticuerpo monoclonal obtenido en (a) mediante métodos públicamente conocidos, o bien se expresa artificialmente el gen de anticuerpo monoclonal obtenido en (b). El anticuerpo monoclonal también se puede fabricar mediante la incorporación del gen de anticuerpo en un cromosoma de un animal de sangre caliente o planta, mediante los métodos públicamente conocidos, y se produce el anticuerpo monoclonal en sangre, leche, y huevos de animales de sangre caliente, en cuerpos de plantas, en moho, etc. [Curr. Opin. Biotechnol., 7, 536 (1996), Nature Rev. Genet., 4, 794 (2003), Appl. Environ. Microbiol., 70, 2567 (2004)]. Los ejemplos de los animales de sangre caliente utilizados son bovinos, cabras, ovejas, cerdos, aves de corral, ratón, conejo, etc. Los ejemplos de los cuerpos de plantas son tabaco, maíz dulce, papa, lemna, etc.

Se pueden emplear diversos métodos para el rastreo de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Los ejemplos de estos métodos incluyen un método que involucra agregar el sobrenadante de cultivo de un hibridoma a una fase sólida (por ejemplo, una microplaca) adsorbida con un antígeno de proteína soluble o con una célula que exprese el antígeno de proteína, directamente o junto con un vehículo, seguido por la reacción con un anticuerpo anti-inmunoglobulina (por ejemplo, cuando las células de bazo utilizadas para la fusión celular son de ratón, se utiliza un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón) marcado con una sustancia radioactiva, una enzima, una sustancia fluorescente, etc., o con la Proteína A, y se detecta el anticuerpo monoclonal enlazado a la fase sólida; un método que involucra agregar el sobrenadante del hibridoma a una fase sólida adsorbida con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o Proteína A, seguido por la

reacción con un antígeno de proteína soluble marcado con una sustancia radioactiva, una enzima, o una sustancia fluorescente, etc., y se detecta el anticuerpo monoclonal específico del antígeno enlazado a la fase sólida, etc. Cuando se utiliza la célula que expresa el antígeno de proteína, se agrega el sobrenadante de cultivo del hibridoma a la célula, seguido por la reacción con un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con fluorescencia, y se ensaya la intensidad de fluorescencia de la célula en un detector de fluorescencia, tal como un citómetro de flujo, etc. Por consiguiente, se puede detectar el anticuerpo monoclonal enlazado al antígeno de proteína sobre la membrana celular.

El anticuerpo monoclonal utilizado en la presente invención se puede purificar a partir de los materiales brutos descritos anteriormente que contengan el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante los métodos públicamente conocidos para la separación y purificación de inmunoglobulinas [por ejemplo, extracción de sal, precipitación con alcohol, precipitación isoeléctrica, diversas cromatografías tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en fase inversa, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía por afinidad, en donde solamente se pueda separar y purificar el anticuerpo con un vehículo en el que se inmovilice una sustancia que tenga afinidad por el anticuerpo, tal como antígeno, proteína A, y proteína G, etc.], y similares.

(7)-(iii) Rastreo del enlace competitivo de anticuerpos a la nectina-2 con el anticuerpo utilizado como el agente de esta invención para prevenir/tratar cáncer de mama

El anticuerpo que se une en forma competitiva con el anticuerpo utilizado en la presente invención puede obtenerse por selección en un ensayo para determinar si el anticuerpo se une a la

412

nectina-2 en forma competitiva con el anticuerpo utilizado en la presente invención.

La "nectina-2" utilizada para la selección es la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (de aquí en adelante denominada abreviadamente nectina-2α) o la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 (de aquí en adelante denominada abreviadamente nectina-2δ) (de aquí en adelante ambas nectinas se denominan a veces colectivamente nectina-2 o la proteína usada en la presente invención). La nectina-2 puede consistir en proteínas derivadas de células o tejidos humanos o de animales de sangre caliente, o proteínas recombinantes. También pueden ser péptidos representados por una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. Ejemplos de la nectina-2 que pueden utilizarse son un péptido representado por la secuencia de los aminoácidos 1-350 (dominio extracelular) de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ), un péptido representado por la secuencia de los aminoácidos 47-142 (el primer dominio de tipo IG) de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ), o un péptido representado por la secuencia de los aminoácidos 175-240 (el segundo dominio de tipo IG) de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (nectina-2α) o SEQ ID NO: 3 (nectina-2δ) y similares. La nectina-2 incluye además péptidos en los cuales el grupo carboxilo C-terminal está esterificado o amidado, aquellos en los cuales el grupo amino del residuo de aminoácido N-terminal (por ejemplo, residuo de metionina) está protegido con un grupo protector, aquellos en los cuales la región N-terminal se escinde *in vivo* y el residuo glutamilo así formado se convierte en piroglutamato; aquéllos en los cuales un sustituyente de la cadena lateral de un

aminoácido de la molécula se protege con un grupo protector adecuado, o péptidos conjugados tales como glicopéptidos unidos a cadenas de azúcares, etc. Estos péptidos pueden encontrarse en forma de sales con ácidos (por ejemplo, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos) o bases (por ejemplo, sales de metales alcalinos) fisiológicamente aceptables, etc.

Como se emplea en la presente, el término "anticuerpo que se une en forma competitiva" se refiere a un anticuerpo cuya unión a la nectina-2 es inhibida en forma competitiva agregando un exceso de cualquiera de los anticuerpos utilizados en la presente invención. Específicamente, el anticuerpo se refiere a, por ejemplo, un anticuerpo que exhibe por lo menos un 50% de inhibición frente a la unión de un anticuerpo de ensayo a la nectina-2, cuando se agrega una cantidad en moles 50 veces mayor de cualquiera de los anticuerpos usados en la presente invención a dicho anticuerpo sometido a ensayo.

Como se emplea en la presente, el anticuerpo usado en la presente invención incluye un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo que tiene las regiones variables derivadas de un anticuerpo de una especie diferente y regiones constantes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, EP 0125023, etc.). "Anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo diseñado para modificar un anticuerpo humano-heterólogo como un anticuerpo de ratón, por reemplazo de su estructura primaria distinta de las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas H y L con la estructura primaria correspondiente de un anticuerpo humano. "Anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal preparado usando un animal transgénico portador de genes de anticuerpos humanos (ver EP 0546073) y un anticuerpo monoclonal preparado usando una biblioteca en la cual un gen de

anticuerpo humano se presenta sobre la superficie celular de bacteriófagos, Escherichia coli, levaduras, células animales, etc., la así llamada tecnología de despliegue de anticuerpos (Nature Biotechnology, 23, 1105 (2005)), y un anticuerpo monoclonal aislado de células B humanas que producen un anticuerpo contra la nectina-2 utilizando fusión celular, despliegue de fagos o similares. El anticuerpo usado en la presente invención es con preferencia un anticuerpo monoclonal con las regiones constantes del anticuerpo pertenecientes a un anticuerpo humano, con mayor preferencia IgG humana y con máxima preferencia la subclase IgG_1 humana.

(8) Agente para prevenir/tratar el cáncer de mama de la presente invención

El medicamento que comprende el anticuerpo mencionado con anterioridad utilizado en la presente invención o el anticuerpo que se une a la nectina-2 en forma competitiva con el anticuerpo utilizado en la presente invención puede emplearse como agente para prevenir/tratar el cáncer de mama, un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama usando un mecanismo de defensa del hospedante mediado por la región Fc del anticuerpo, un agente citotóxico anticuerpo-dependiente contra células de cáncer de mama, etc. El método para dañar células de cáncer de mama que utiliza un mecanismo de defensa del hospedante mediado por la región Fc del anticuerpo incluye citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente (ADCC) por células efectoras del organismo vivo y citotoxicidad complemento-dependiente (CDC), y se utiliza con preferencia ADCC.

El anticuerpo utilizado en la presente invención o el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención es de baja toxicidad, y se puede administrar oralmente o parenteralmente (por ejemplo, administración intravascular, administración subcutánea,

4-15.

etc.) a seres humanos o mamíferos (por ejemplo, ratas, conejos, ovejas, cerdos, bovinos, gatos, perros, monos, etc.), debido a que está en la forma de una preparación líquida o como una composición farmacéutica de una forma de dosificación apropiada.

El anticuerpo utilizado en la presente invención o el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención, se puede administrar directamente, o se puede administrar como una composición farmacéutica apropiada. La composición farmacéutica utilizada para la administración puede contener el anticuerpo utilizado en la presente invención y su sal, un vehículo farmacológicamente aceptable, y un diluyente o excipiente. Esta composición farmacéutica se proporciona en la forma de dosificación adecuada para administración oral o parenteral.

Los ejemplos de la composición para su administración parenteral son preparaciones inyectables, supositorios, etc. Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación tales como inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones de goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar mediante los métodos públicamente conocidos. Las preparaciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, mediante la disolución, suspensión, o emulsión del anticuerpo de la presente invención o su sal en un medio acuoso estéril o en un medio oleoso convencionalmente utilizados para inyecciones. Como el medio acuoso para inyecciones se utilizan, por ejemplo, suero fisiológico, una solución isotónica que contenga glucosa y otros agentes auxiliares, etc., los cuales se pueden utilizar en combinación con un agente solubilizante apropiado, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 moles) aducto

de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como el medio oleoso, por ejemplo, están, por ejemplo, aceite de ajonjolí, aceite de semilla de soya, etc., los cuales se pueden utilizar en combinación con un agente solubilizante, tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La preparación inyectable preparada de esta manera se rellena usualmente en una ampolleta apropiada. El supositorio utilizado para administración rectal se puede preparar mediante la mezcla del anticuerpo de la presente invención o su sal con bases convencionales para supositorios.

La composición para su administración oral incluye formas de dosificación sólidas o líquidas, específicamente tabletas (incluyendo grageas y tabletas recubiertas de película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), jarabe, emulsiones, suspensiones, etc. Esta composición se fabrica mediante los métodos públicamente conocidos, y puede contener un vehículo, diluyente, o excipiente convencionalmente utilizado en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Los ejemplos del vehículo o excipiente para tabletas son lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio, etc.

De una manera conveniente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral, como se describen anteriormente, se preparan para obtener las preparaciones farmacéuticas con una forma de dosificación unitaria adecuada para una dosis de los ingredientes activos. Estas formas de dosificación unitaria incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampolletas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo utilizado en la presente invención o del anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención contenido, es en general de 5 a 500 miligramos por forma unitaria de dosificación; se prefiere que el anticuerpo descrito anteriormente esté contenido en de aproximadamente 5 a

aproximadamente 100 miligramos en especial en la forma de inyección, y en de 10 a 250 miligramos para las otras formas de dosificación.

La dosis del agente preventivo/terapéutico anteriormente mencionado, o del regulador que comprende el anticuerpo utilizado en la presente invención o el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención, puede variar dependiendo del sujeto al que se vaya a administrar, de la enfermedad objetivo, de las condiciones, de la vía de administración, etc., pero el agente o regulador se puede administrar de una manera conveniente intravenosamente en una sola dosis de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 miligramos/kilogramo de peso corporal, de preferencia de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 miligramos/kilogramo de peso corporal, y de una manera muy preferible de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 miligramos/kilogramo de peso corporal por administración como el anticuerpo de la presente invención, de aproximadamente 1 a 5 veces al día, de preferencia de aproximadamente 1 a 3 veces al día cuando éste se utiliza para tratar/prevenir, por ejemplo, cáncer de mama en adultos. También, en otra administración parenteral y oral, el agente o regulador se puede administrar en una dosis correspondiente a la dosis dada anteriormente. Cuando la condición sea especialmente grave, se puede aumentar la dosis de acuerdo con la condición.

El anticuerpo utilizado en la presente invención o el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención, se puede administrar como esté, o en la forma de una composición farmacéutica apropiada. La composición farmacéutica utilizada para la administración anteriormente mencionada contiene el anticuerpo

anteriormente mencionado o sus sales, un vehículo farmacológicamente aceptable, y un diluyente o excipiente; y esta composición se proporciona en la forma de dosificación adecuada para administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, inyección subcutánea, etc.).

Cada composición descrita anteriormente puede contener además otros componentes activos, a menos que la formulación provoque cualquier interacción adversa mediante su formulación con el anticuerpo descrito en lo anterior.

Adicionalmente, el anticuerpo utilizado en la presente invención o el anticuerpo que se enlaza de una manera competitiva a nectina-2 con el anticuerpo utilizado en la presente invención, se puede utilizar en combinación con otros fármacos, por ejemplo, los agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, etc.), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato, 5-fluoro-uracilo, gemcitabina, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina, etc.), agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, etc.), agentes terapéuticos de hormonas (por ejemplo, tamoxifeno, anastrozol, letrozol, etc.), preparaciones de platino (por ejemplo, cisplatina, carboplatina, etc.), agentes de dirección molecular (por ejemplo, herceptina, gefitinib e imatinib, etc.), etoposida, irinotecano, etc. El anticuerpo utilizado en la presente invención y los fármacos descritos anteriormente, se pueden administrar simultáneamente o en tiempos escalonados al paciente.

(8) Esta invención incluye además las siguientes características.

Es decir: la presente invención también se refiere a la célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807); el anticuerpo monoclonal producido a partir de la célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-

3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807); el anticuerpo monoclonal que se une en forma competitiva con el anticuerpo monoclonal producido a partir de la célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807); y el agente para prevenir o tratar el cáncer de mama que comprende estos anticuerpos monoclonales.

Estas características pueden implementarse como en las realizaciones (6) a (8) descritas con anterioridad.

El hibridoma Nec1-1044-4 ha sido depositado en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, situado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) bajo el Número de Acceso FERM BP-10805 desde el 3 de abril de 2007.

El hibridoma Nec8-3517-11 ha sido depositado en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, situado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) bajo el Número de Acceso FERM BP-10806 desde el 3 de abril de 2007.

El hibridoma Nec8-3704-7 ha sido depositado en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, situado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) bajo el Número de Acceso FERM BP-10807 desde el 3 de abril de 2007.

En la memoria descriptiva y dibujos, donde las bases, aminoácidos, etc. se indican por sus abreviaturas, estas se basan en códigos convencionales de acuerdo con la Comisión de nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB o por los códigos comunes de la técnica, cuyos ejemplos se muestran a continuación. Para los aminoácidos que pueden tener isómero óptico, se presenta la forma L a menos que se indique lo contrario.

420

ADN : ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

A : adenina

T : timina

G : guanina

C : citosina

ARN : ácido ribonucleico

ARNm : ácido ribonucleico mensajero

dATP : trifosfato de desoxiadenosina

dTTP : trifosfato de desoxitimidina

dGTP: trifosfato de desoxiguanina

dCTP: trifosfato de desoxicitidina

ATP : trifosfato de adenosina

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

SDS : sulfato de dodecil sódico

Gly : glicina

Ala : alanina

Val : valina

Leu : leucina

Ile : isoleucina

Ser : serina

Thr : treonina

Cys : cisteína

Met : metionina

Glu : ácido glutámico

Asp : ácido aspártico

Lys : lisina

Arg : arginina

His : histidina

Phe : fenilalanina

Tyr : tirosina

421

Trp : triptófano

Pro : prolina

Asn : asparagina

Gln : glutamina

pGlu : ácido piroglutámico

Sec : selenocisteína

Los números de identificación de secuencias del listado de secuencias de la memoria descriptiva indican las siguientes secuencias.

[SEQ ID NO: 1]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de nectina-2α.

[SEQ ID NO: 2]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la nectina-2α que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1.

[SEQ ID NO: 3]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la nectina-2δ.

[SEQ ID NO: 4]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la nectina-2δ que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3.

[SEQ ID NO: 5]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la nectina-3.

[SEQ ID NO: 6]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la nectina-3 que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5.

[SEQ ID NO: 7]

Ésta muestra la secuencia base del oligonucleótido antisentido 1 usado en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 1 y 2.

[SEQ ID NO: 8]

Ésta muestra la secuencia base del oligonucleótido control 1 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 1 y 2.

[SEQ ID NO: 9]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 1 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2.

[SEQ ID NO: 10]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 2 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2.

[SEQ ID NO: 11]

Ésta muestra la secuencia base de la sonda TaqMan 1 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2.

[SEQ ID NO: 12]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 3 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2.

[SEQ ID NO: 13]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 4 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2.

[SEQ ID NO: 14]

Ésta muestra la secuencia base de la sonda TaqMan 2 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2.

[SEQ ID NO: 15]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 5 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 3 y 4.

[SEQ ID NO: 16]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 6 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 3.

[SEQ ID NO: 17]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 7 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4.

[SEQ ID NO: 18]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 8 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 5.

[SEQ ID NO: 19]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-1 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 20]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-1 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 21]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-2 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 22]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-2 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 23]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-3 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 24]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-3 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 25]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-4 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 26]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-4 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 27]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-5 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 28]

Ésta muestra la secuencia base del ARNsi-5 usada en los

424

EJEMPLOS DE REFERENCIA 5, 6 y 7.

[SEQ ID NO: 29]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 33 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 12.

[SEQ ID NO: 30]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 34 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 12.

[SEQ ID NO: 31]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2ED-FLAG.

[SEQ ID NO: 32]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2ED- FLAG representada por la SEQ ID NO: 31.

[SEQ ID NO: 33]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 33 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15.

[SEQ ID NO: 34]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 34 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15.

[SEQ ID NO: 35]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 35 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15.

[SEQ ID NO: 36]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 36 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15.

[SEQ ID NO: 37]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2ED-hFc.

[SEQ ID NO: 38]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la

425

secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2ED-FLAG representada por la SEQ ID NO: 37.

[SEQ ID NO: 39]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos del péptido 1 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 17.

[SEQ ID NO: 40]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos del péptido 2 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 17.

[SEQ ID NO: 41]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos del péptido 3 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 17.

[SEQ ID NO: 42]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 42 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 18 y 19.

[SEQ ID NO: 43]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 43 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 18 y 19.

[SEQ ID NO: 44]

Ésta muestra la secuencia base de la sonda TaqMan 3 usada en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 18 y 19.

[SEQ ID NO: 45]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 45 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 21.

[SEQ ID NO: 46]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 46 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 21.

[SEQ ID NO: 47]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 47 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 21.

[SEQ ID NO: 48]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 48 usada en el

426

EJEMPLO DE REFERENCIA 21.

[SEQ ID NO: 49]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de nectina-3ED-proteína hFc.

[SEQ ID NO: 50]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-3ED-hFc representada por la SEQ ID NO: 49.

[SEQ ID NO: 51]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-3ED-mFc.

[SEQ ID NO: 52]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-3ED-mFc representada por la SEQ ID NO: 51.

[SEQ ID NO: 53]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína FLAG (FLAG-FSALNOT) usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 25.

[SEQ ID NO: 54]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína FLAG (FLAG-RSALNOT) usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 25.

[SEQ ID NO: 55]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 55 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 25.

[SEQ ID NO: 56]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 56 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 25.

[SEQ ID NO: 57]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína

427

nectina-3ED-FLAG.

[SEQ ID NO: 58]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2ED-FLAG.

[SEQ ID NO: 59]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 59 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 60]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 60 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 61]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de nectina-1.

[SEQ ID NO: 62]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de nectina-1.

[SEQ ID NO: 63]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 63 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 64]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 64 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 65]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 65 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 66]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 66 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 67]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de nectina-4.

428

[SEQ ID NO: 68]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-4.

[SEQ ID NO: 69]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 69 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 70]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 70 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29.

[SEQ ID NO: 71]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína Nec1- 5.

[SEQ ID NO: 72]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína Nec1- 5.

[SEQ ID NO: 73]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 73 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 30.

[SEQ ID NO: 74]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 74 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 30.

[SEQ ID NO: 75]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 75 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 30.

[SEQ ID NO: 76]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 76 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 30.

[SEQ ID NO: 77]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 77 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 30.

[SEQ ID NO: 78]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína deficiente del dominio Ig1 de la nectina-2.

[SEQ ID NO: 79]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína deficiente del dominio Ig1 de la nectina-2.

[SEQ ID NO: 80]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína deficiente del dominio Ig2 de la nectina-2.

[SEQ ID NO: 81]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína deficiente del dominio Ig2 de la nectina-2.

[SEQ ID NO: 82]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 82 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 31.

[SEQ ID NO: 83]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 83 usad en el EJEMPLO DE REFERENCIA 31.

[SEQ ID NO: 84]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 84 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 31.

[SEQ ID NO: 85]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 85 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 31.

[SEQ ID NO: 86]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2 del mono cinomolgo.

[SEQ ID NO: 87]

Ésta muestra la secuencia base del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de la nectina-2 del mono

cinomolgo.

[SEQ ID NO: 88]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 88 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 32.

[SEQ ID NO: 89]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 89 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 32.

[SEQ ID NO: 90]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 90 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 91]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 91 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 92]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 92 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 93]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 93 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 94]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 94 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 95]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 95 usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 96]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 96 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

[SEQ ID NO: 97]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 97 usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33.

431

[SEQ ID NO: 98]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q37A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 99]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q37A R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 100]

Ésta muestra la secuencia base del cebador P40G usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 101]

Ésta muestra la secuencia base del cebador P40GR usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 102]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q45A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 103]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q45AR usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 104]

Ésta muestra la secuencia base del cebador H55A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 105]

Ésta muestra la secuencia base del cebador H55A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 106]

Ésta muestra la secuencia base del cebador V60A usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 107]

Ésta muestra la secuencia base del cebador V60A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 108]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Y64A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 109]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Y64A R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 110]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q71A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 111]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q71A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 112]

Ésta muestra la secuencia base del cebador A75G usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 113]

Ésta muestra la secuencia base del cebador A75G R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 114]

Ésta muestra la secuencia base del cebador P76G usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 115]

Ésta muestra la secuencia base del cebador P76G R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 116]

Ésta muestra la secuencia base del cebador A77G usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 117]

Ésta muestra la secuencia base del cebador A77G R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 118]

Ésta muestra la secuencia base del cebador N78A usado en

el EJEMPLO DE REFERENCIA h 34.

[SEQ ID NO: 119]

Ésta muestra la secuencia base del cebador N78A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 120]

Ésta muestra la secuencia base del cebador H79A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 121]

Ésta muestra la secuencia base del cebador H79A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 122]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q80A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 123]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q80A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 124]

Ésta muestra la secuencia base del cebador N81A usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 125]

Ésta muestra la secuencia base del cebador N81A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 126]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K88A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 127]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K88A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 128]

Ésta muestra la secuencia base del cebador S95A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

434

[SEQ ID NO: 129]

Ésta muestra la secuencia base del cebador S95A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 130]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K109A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 131]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K109A R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 132]

Ésta muestra la secuencia base del cebador E117A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 133]

Ésta muestra la secuencia base del cebador E117A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 134]

Ésta muestra la secuencia base del cebador D122A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 135]

Ésta muestra la secuencia base del cebador D122A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 136]

Ésta muestra la secuencia base del cebador H128A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 137]

Ésta muestra la secuencia base del cebador H128A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 138]

Ésta muestra la secuencia base del cebador N137A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 139]

435

Ésta muestra la secuencia base del cebador N137A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 140]

Ésta muestra la secuencia base del cebador F145A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 141]

Ésta muestra la secuencia base del cebador F145A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 142]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K147A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 143]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K147A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 144]

Ésta muestra la secuencia base del cebador V150A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 145]

Ésta muestra la secuencia base del cebador V150A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 146]

Ésta muestra la secuencia base del cebador M153A usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 147]

Ésta muestra la secuencia base del cebador M153A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 148]

Ésta muestra la secuencia base del cebador T154A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 149]

Ésta muestra la secuencia base del cebador T154A R usado

436

en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34.

[SEQ ID NO: 150]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q165A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 151]

Ésta muestra la secuencia base del cebador Q165A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 152]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K170A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 153]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K170A R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 154]

Ésta muestra la secuencia base del cebador F173A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 155]

Ésta muestra la secuencia base del cebador F173A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 156]

Ésta muestra la secuencia base del cebador P177G usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 157]

Ésta muestra la secuencia base del cebador P177G R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 158]

Ésta muestra la secuencia base del cebador I184A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 159]

Ésta muestra la secuencia base del cebador I184A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 160]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K186A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 161]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K186A R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 162]

Ésta muestra la secuencia base del cebador L197A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 163]

Ésta muestra la secuencia base del cebador L197A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 164]

Ésta muestra la secuencia base del cebador W202A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 165]

Ésta muestra la secuencia base del cebador W202A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 166]

Ésta muestra la secuencia base del cebador E206A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 167]

Ésta muestra la secuencia base del cebador E206A R usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 168]

Ésta muestra la secuencia base del cebador T212A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 169]

Ésta muestra la secuencia base del cebador T212A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 170]

438

Ésta muestra la secuencia base del cebador T235A usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 171]

Ésta muestra la secuencia base del cebador T235A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 172]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K239A usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 173]

Ésta muestra la secuencia base del cebador K239A R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 174]

Ésta muestra la secuencia base del cebador A249G usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 175]

Ésta muestra la secuencia base del cebador A249G R usado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35.

[SEQ ID NO: 176]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 176 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 177]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 177 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 178]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 178 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 179]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 179 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 180]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 180 usado en el

EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 181]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 181 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 182]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 182 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 183]

Ésta muestra la secuencia base del cebador 183 usado en el EJEMPLO 19.

[SEQ ID NO: 184]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-244-3 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 185]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-244-3 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 186]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-244-3 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 187]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de Nec1- 244-3.

[SEQ ID NO: 188]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-244-3 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 189]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-244-3 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 190]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-244-3 (secuencia base).

440.

[SEQ ID NO: 191]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1- 244-3.

[SEQ ID NO: 192]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-244-3 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 193]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-244-3 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 194]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de la Nec1-244-3 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 195]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec1- 244-3.

[SEQ ID NO: 196]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-244-3 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 197]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-244-3 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 198]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-244-3 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 199]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1- 244-3.

[SEQ ID NO: 200]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-530-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 201]

441.

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-530-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 202]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-530-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 203]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 530-1.

[SEQ ID NO: 204]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-530-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 205]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-530-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 206]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-530-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 207]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1- 530-1.

[SEQ ID NO: 208]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-530-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 209]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-530-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 210]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-530-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 211]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región

442

variable de cadena liviana de Nec1- 530-1.

[SEQ ID NO: 212]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-530-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 213]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-530-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 214]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-530-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 215]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1- 530-1.

[SEQ ID NO: 216]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-554-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 217]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-554-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 218]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-554-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 219]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 554-1.

[SEQ ID NO: 220]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-554-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 221]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-554-1 (secuencia base).

443

[SEQ ID NO: 222]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-554-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 223]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1-554-1.

[SEQ ID NO: 224]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-554-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 225]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-554-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 226]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-554-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 227]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec1- 554-1.

[SEQ ID NO: 228]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-554-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 229]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-554-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 230]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-554-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 231]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1-554-1.

[SEQ ID NO: 232]

444

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-803-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 233]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-803-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 234]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-803-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 235]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 803-2.

[SEQ ID NO: 236]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-803-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 237]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-803-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 238]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-803-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 239]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1- 803-2.

[SEQ ID NO: 240]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-803-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 241]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-803-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 242]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-803-2

445

(secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 243]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec1- 803-2.

[SEQ ID NO: 244]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-803-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 245]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-803-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 246]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-803-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 247]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1- 803-2.

[SEQ ID NO: 248]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-834-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 249]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-834-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 250]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-834-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 251]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 834-1.

[SEQ ID NO: 252]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-834-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 253]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-834-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 254]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-834-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 255]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1- 834-1.

[SEQ ID NO: 256]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-834-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 257]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-834-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 258]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-834-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 259]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec1- 834-1.

[SEQ ID NO: 260]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-834-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 261]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-834-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 262]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-834-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 263]

447

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1- 834-1.

[SEQ ID NO: 264]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-845-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 265]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-845-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 266]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-845-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 267]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 845-2.

[SEQ ID NO: 268]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-845-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 269]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-845-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 270]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-845-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 271]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1- 845-2.

[SEQ ID NO: 272]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-845-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 273]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-845-2

448

(secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 274]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-845-2 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 275]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec1- 845-2.

[SEQ ID NO: 276]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-845-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 277]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-845-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 278]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-845-2 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 279]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1- 845-2.

[SEQ ID NO: 280]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-903-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 281]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-903-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 282]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-903-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 283]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1-903-1.

449

[SEQ ID NO: 284]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec1-903-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 285]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec1-903-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 286]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec1-903-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 287]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena pesada de Nec1- 903-1.

[SEQ ID NO: 288]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-903-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 289]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-903-1 (secuencia de aminoácidos.

[SEQ ID NO: 290]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-903-1 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 291]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec1- 903-1.

[SEQ ID NO: 292]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec1-903-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 293]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec1-903-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 294]

450

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec1-903-1 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 295]

Ésta muestra la secuencia base de la región variable de cadena liviana de Nec1- 903-1.

[SEQ ID NO: 296]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec8-4116-8 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 297]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec8-4116-8 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 298]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec8-4116-8 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 299]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 4116-8.

[SEQ ID NO: 300]

Esta muestra el CDR1 de la cadena pesada de Nec8-4116-8 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 301]

Esta muestra el CDR2 de la cadena pesada de Nec8-4116-8 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 302]

Esta muestra el CDR3 de la cadena pesada de Nec8-4116-8 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 303]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Nec1- 4116-8.

[SEQ ID NO: 304]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec8-4116-8

451

(secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 305]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec8-4116-8 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 306]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec8-4116-8 (secuencia de aminoácidos).

[SEQ ID NO: 307]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec8- 4116-8.

[SEQ ID NO: 308]

Esta muestra el CDR1 de la cadena liviana de Nec8-4116-8 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 309]

Esta muestra el CDR2 de la cadena liviana de Nec8-4116-8 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 310]

Esta muestra el CDR3 de la cadena liviana de Nec8-4116-8 (secuencia base).

[SEQ ID NO: 311]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de Nec8- 4116-8.

[SEQ ID NO: 312]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena H de la preparación de anticuerpo obtenida en el EJEMPLO DE REFERENCIA 38.

[SEQ ID NO: 313]

Ésta muestra la secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena L de la preparación de anticuerpo obtenida en el EJEMPLO DE REFERENCIA 38.

[SEQ ID NO: 314]

452

Ésta muestra la secuencia de bases que codifica el extremo N-terminal de la secuencia señal putativa de la línea germinal coincidente con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 312.

[SEQ ID NO: 315]

Ésta muestra la secuencia de bases que codifica el extremo N-terminal de la secuencia señal putativa de la línea germinal coincidente con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 313.

[SEQ ID NO: 316]

Ésta muestra la secuencia de bases del cebador utilizado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 38.

[SEQ ID NO: 317]

Ésta muestra la secuencia de bases del cebador utilizado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 38.

El hibridoma Nec1-803-2 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) bajo el Número de acceso FERM BP-10417 desde el 16 de septiembre de 2005.

El hibridoma Nec1-244-3 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10423 desde el 4 de octubre de 2005.

El hibridoma Nec1-530-1 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de

Acceso FERM BP-10424 desde el 4 de octubre de 2005.

El hibridoma Nec1-903-1 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal : 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10425 desde el 4 de octubre de 2005.

El hibridoma Nec1-520-1 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10426 desde el 4 de octubre de 2005.

El hibridoma Nec1-845-2 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10427 desde el 4 de octubre de 2005.

El hibridoma Nec1-834-1 obtenido del EJEMPLO 1 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10428 desde el 4 de octubre de 2005.

El hibridoma Nec1-554-1 obtenido del EJEMPLO 8 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10681 desde el 20 de septiembre de 2006.

El hibridoma Nec1-769-2 obtenido del EJEMPLO 8 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10682 desde el 20 de septiembre de 2006.

El hibridoma Nec1-964-1 obtenido del EJEMPLO 8 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10683 desde el 20 de septiembre de 2006.

El hibridoma Nec1-1302-2 obtenido del EJEMPLO 8 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10684 desde el 20 de septiembre de 2006.

El hibridoma Nec8-4116-8 obtenido del EJEMPLO 8 que se describe más adelante ha sido depositado en International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ubicado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (código postal: 305-8566) con el Número de Acceso FERM BP-10685 desde el 20 de septiembre de 2006.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención describirá específicamente por referencia a los EJEMPLOS DE REFERENCIA y EJEMPLOS pero no se considera que estén limitados a los mismos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

La inducción de apoptosis en la línea de célula cancerosa HT-29

del colon humano por el oligonucleótido antisentido del gen de la nectina-2α y gen de la nectina-2δ.

Después de que se diseñó la secuencia del oligonucleótido antisentido (SEQ ID NO: 7) que se puede hibridizar con la región codificadora del gen de nectina-2α o la región del intrón del gen de la nectina-2δ, se sintetizó el oligonucleótido fosforotioatado para obtener el producto purificado por HPLC (de aquí en adelante mencionado simplemente como oligonucleótido antisentido 1). Para control, el oligonucleótido (SEQ ID NO: 8) que tiene una secuencia inversa de la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 7 fue también fosforotioatada para obtener el producto purificado por HPLC auténtico (de aquí en adelante mencionado simplemente como oligonucleótido control 1).

La línea de célula cancerosa HT-29 del colon humano comprada en American Type Culture Collection (ATCC) se suspendió en medio McCoy's 5A (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (JRH) [de aquí en adelante algunas veces abreviado como medio M5], e incubado en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 96 pocillos (Becton Dickinson) con una densidad celular de 1 x 10^4 células/pocillo, seguido por la incubación a 37°C durante toda la noche en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. El oligonucleótido antisentido 1, 200 ng, o 200 ng del oligonucleótido de control 1 se mezclaron con 50 µl de Opti-MEM I (Invitrogen) junto con 0.5 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El volumen total de la mezcla de la solución anterior se agregó al cultivo de células HT-29, cuyo medio había sido intercambiado previamente con 50 µl de Opti-MEM I, la incubación continuó durante 3 horas adicionales a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. A partir de entonces, el medio se intercambió

otra vez con medio M5. Después la incubación continuó durante 2 días adicionales, la actividad de inducción de apoptosis del oligonucleótido anterior se midió mediante el ensayo Caspasa-Glo 3/7 (Promega) de acuerdo con el protocolo adjunto. Como resultado, el oligonucleótido antisentido 1 (SEQ ID NO: 7) del gen de la nectina-2α y gen de la nectina-2δ demostró una inducción de apoptosis de aproximadamente 1.9 veces superior que el oligonucleótido control 1 (SEQ ID NO: 8), lo cual indica que hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$).

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

La reducción de los niveles de expresión del ARNm del gen de nectina-2α y gen de nectina-2δ de la línea de célula cancerosa HT-29 del colon humano por el oligonucleótido antisentido del gen de nectina-2α y gen de nectina-2δ.

La línea de célula cancerosa HT-29 del colon humano usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 1 se suspendió en el medio M5 y se incubó una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 24 pocillos (Becton Dickinson) con una densidad celular de 6 x 10^4 células/pocillo. Después de que las células se incubaron durante toda la noche a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, el oligonucleótido antisentido 1 o el oligonucleótido control se transfectó por el procedimiento del EJEMPLO DE REFERENCIA 1, excepto que el peso o volumen de todos los aditivos se aumentó en una escala de 6 veces en proporción con el recuento de las células sembradas. Después de que estas células se incubaron a 37°C durante 24 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, se extrajo el ARN total por el kit de RNeasy Mini Total ARN (QIAGEN). Usando aproximadamente 400 ng del ARN total como molde, se realizó la transcripción reversa para preparar ADNc con reactivos de transcripción reversa TaqMan (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo adjunto. Se midió

el nivel de expresión del gen de la nectina-2α por PCR cuantitativa que emplea ADNc como molde en una cantidad correspondiente a 5 ng cuando se calcula como ARN total; la solución de reacción esta compuesta de 15 µl por la adición de 7.5 µl de mezcla TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems), 500 nM de cada cebador 1 (SEQ ID NO: 9) y cebador 2 (SEQ ID NO: 10) y 100 nM de sonda Taqman 1 marcada en FAM 1 (SEQ ID NO: 11). Se realizó la PCR por la reacción a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. El nivel de expresión de nectina-2δ se midió como en el gen de nectina-2α por PCR cuantitativa, en la cual se usó el ADNc como molde en una cantidad correspondiente a 5 ng cuando se calcula como ARN total y la solución de reacción está compuesta de 15 µl por la adición de 7.5 µl de mezcla, 500 nM de cada cebador 3 (SEQ ID NO: 12) y cebador 4 (SEQ ID NO: 13) y 100 nM de sonda Taqman 2 marcada en FAM (SEQ ID NO: 14). Se realizó la PCR por la reacción a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. El nivel de expresión de ARNm para el gen de β-actina contenido en la misma cantidad del molde de ADNc se ensayó con el reactivo de control de β-actina TaqMan (Applied Biosystems), el cual se usó como estándar interno.

Cuando ningún oligonucleótido fue transfectado, los niveles de expresión de los genes de la nectina-2α y nectina-2δ fueron 0.15% y 0.76% de los niveles de expresión del gen de β-actina, respectivamente. En los grupos dados con el oligonucleótido antisentido 1 (SEQ ID NO: 7), los niveles de expresión de los genes de la nectina-2α y nectina-2δ fueron 0.095% y 0.45%, respectivamente, lo cual indica que se observó una reducción estadísticamente significativa ($P<0.01$) del nivel de expresión

cuando se compara con el caso en que no se transfectó el oligonucleótido. A la inversa, en el grupo dado con el oligonucleótido control 1 (SEQ ID NO: 8) usado como control negativo, los niveles de expresión de los genes de la nectina-2α y nectina-2δ fueron 0.18% y 0.76%, respectivamente, lo cual indica que fue igual al caso en que en que no se transfectó el oligonucleótido.

Estos resultados y los resultados del EJEMPLO DE REFERENCIA 1 sugieren que la reducción de los niveles de expresión de los genes de nectina-2α y nectina-2δ indujo la apoptosis de la línea de la célula cancerosa HT-29 del colon humano.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

Clonación y secuenciación de bases del ADNc que codifica la nectina-2α

Se emplea una línea de células cancerosas de pulmón humano A549 derivada del ADNc Marathon-Ready (BD Biosciences) como molde, se realizó la PCR usando el cebador 5 (SEQ ID NO: 15) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 6 (SEQ ID NO: 16) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μl del ADNc descrito anteriormente, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart (STRATAGENE), 1 μM de cada cebador 5 (SEQ ID NO: 15) y cebador 6 (SEQ ID NO: 16), 200 μM de los dNTP y 10 μL de 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 94°C durante 1 minuto y luego se repitió 5 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 4 minutos, 5 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 5 segundos y 70°C durante 4 minutos y 35 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 5 segundos y 68°C

durante 4 minutos. Después, el producto del PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR (QIAGEN). El producto purificado se digirió con las enzimas de restricción TEcoRI y EcoRV. También se trató pADNc3.1(+) (Invitrogen) con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. Estos productos se purificaron con el kit de purificación de PCR. Los fragmentos de ADN respectivo se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio) y luego se transfectaron a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los genes de los clones individuales recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en célula animal pADNc3.1 (+)-Nectina-2α que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 2) que codifica la proteína de la nectina-2α (SEQ ID NO: 1).

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Clonación y secuenciación de bases del ADNc que codifica la nectina-2δ

Se emplea una línea de células cancerosas de pulmón humano A549 derivada del ADNc Marathon-Ready (BD Biosciences) como molde, se realizó la PCR usando el cebador 5 (SEQ ID NO: 15) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 7 (SEQ ID NO: 17) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μl del ADNc anterior usado como molde, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart (STRATAGENE), 1 μM de cada cebador 5 (SEQ ID NO: 15) y cebador 7 (SEQ ID NO: 17), 200 μM de los dNTP y 10 μl de 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar 20 μL totales. La PCR se realizó por la reacción a 94°C durante 1 minuto, luego se repitió 5 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 5 segundos y

460

72°C durante 4 minutos, 5 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 5 segundos y 70°C durante 4 minutos y 35 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 5 segundos y 68°C durante 4 minutos. El producto purificado luego se eluyó con 50 µl de agua usando el kit de purificación de PCR (QIAGEN), y usando el mismo como molde, se llevó a cabo la PCR. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 µl del ADNc anterior usado como molde, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart (STRATAGENE), 1 µM de cada cebador 5 (SEQ ID NO: 15) y cebador 8 (SEQ ID NO: 18) marcado con un sitio de restricción de la enzima EcoRV, 200 µM de los dNTP y 10 µl de 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar 20 µL totales. La PCR se realizó por la reacción a 94°C durante 1 minuto, luego se repitió 25 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos. Después, el producto de PCR se purificó con el kit de purificación de PCR. El producto purificado luego se digirió con la enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. De modo similar, el pADNc3.1(+) (Invitrogen) se digirió con la enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. Después de que estos productos se purificaron con el kit de purificación de PCR, los dos fragmentos de ADN se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio) y luego se transfectó con la Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los genes de los clones individuales recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en célula animal pADNc3.1 (+)-Nectina-2δ que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 4) que codifica la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3).

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Inhibición del crecimiento celular de la línea de la célula cancerosa

HT-29 del colon humano por el ARNsi de la nectina-2

Las mezclas se prepararon por la mezcla de los cinco ARNsi (ARNsi-1, ARNsi-2, ARNsi-3, ARNsi-4 y ARNsi-5) específicos para el ARNm del gen de nectina-2α o nectina-2δ (de aquí en adelante se menciona colectivamente como el gen de la nectina-2) sobre una base de volumen igual (de aquí en adelante las mezclas se mencionan como ARNsi de la nectina-2). Los ARNsi-1, ARNsi-2, ARNsi-3, ARNsi-4 y ARNsi-5 se prepararon por la hibridación de dos fragmentos de ARN, respectivamente (se preparó ARNsi-1 por la hibridación de ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 19 al ARN, que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 20, ARNsi-2 por la hibridación del ARN, que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 21, un ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 22, ARNsi-3 por la hibridación ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 23 al ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 24, ARNsi-4 por hibridación del ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 25 al ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 26, y ARNsi-5 por la hibridación al ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 27 al ARN que tiene la secuencia base representada por la SEQ ID NO: 28). El control IX no específico (de aquí en adelante denominado ARNsd no silenciado) comprado en Dharmacon se usó como control negativo.

Específicamente, la línea de la célula cancerosa HT-29 de colon humano comprada en American Type Culture Collection (ATCC) se suspendió en el medio M5A suplementado con 10% de FBS (JRH) y se incubó en una placa de Petri de cultivo de tejido de 10 cm (Becton Dickinson) con una densidad celular de 5×10^5 células/placa. Después de la incubación durante toda la noche a

462

37°C con un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, las células se desprendieron mediante una solución de tripsina/EDTA y se recuperaron por la operación de centrifugación. Las células HT-29, 1 x 10^6, se suspendieron en 100 µl de solución V incluida en el kit de la línea celular Nucleofector V (Amaxa), tal solución contenía 150 pmol del ARNsi de la nectina-2 o 150 pmol de ARNsd no silenciado y se transfectaron mediante el programa Nucleofector T-20, seguido por la incubación a 37°C durante 24 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Estas células se incubaron otra vez en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 96 pocillos con una densidad celular de 3,000 células/pocillo y la incubación continuó durante 5 días a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Después que se retiró el medio de cada pocillo, la placa se enfrió a -80°C durante 5 minutos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para alterar las células. Después, se agregaron 100 µl de una solución acuosa que contiene 1% de PicoGreen (Invitrogen) y 1% de IGEPAL-CA630 (ICN) a cada pocillo, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se midió la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación a 485 nm y longitud de onda de emisión a 535 nm) mediante un contador Multilabel (Perkin Elmer) para determinar el nivel del ADN de las células. Como resultado, la intensidad de fluorescencia disminuyó en aproximadamente 38% en el grupo de ARNsi de la nectina-2 cuando se compara al grupo ARNsd no silenciado, lo cual indica que hubo diferencia estadísticamente significativa ($P<0.001$). Esto revela que el crecimiento de la línea celular HT-29 fue inhibida significativamente por la adición de el ARNsi de la nectina-2.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

Cambio del ciclo celular de la línea cancerosa humana HT-29 del colon humano por el ARNsi de la nectina-2

463.

La línea de células cancerosas HT-29 del colon humano usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 1 se suspendió en el medio M5A y se incubó en una placa de Petri de cultivo de tejido de 10 cm con una densidad celular de 5 x 10^5 células/placa. Después de la incubación a 37°C en el flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, se transfectó ARNsi de la nectina-2 o ARNds no silenciado como un control negativo por una modificación del procedimiento del EJEMPLO DE REFERENCIA 5. La incubación continuó a 37°C durante 24 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Estas células se incubaron de nuevo en una placa de cultivo de extremo inferior plano de 6 pocillos (Becton Dickinson) con una densidad celular de 2 x 10^5 células/placa y se incubaron a 37°C durante 5 días en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Después que se desprendieron las células del cultivo celular por tratamiento con tripsina-EDTA, se realizó el análisis del ciclo celular mediante FACScan (Becton Dickinson) mediante el kit del reactivo de ADN más CycleTEST (Becton Dickinson). Como resultado, la proporción de células en la fase G0/G1 aumentó en aproximadamente 13% y la proporción de células de la fase en la fase S disminuyó en aproximadamente 11% en el grupo de el ARNsi de la nectina-2 , en comparación con el grupo de ARNsd no silenciado usado como control negativo. Los resultados sugieren que el cambio del ciclo celular de la línea de células cancerosas HT-29 de colon humano fue inducido por el ARNsi de la nectina-2.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

Reducción del nivel de expresión del ARNm de la nectina-2 en la línea de células cancerosas HT-29 del colon humano por el ARNsi de la nectina-2

La línea de células cancerosas HT-29 del colon humano usada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 1 se suspendió en el medio M5A y se incubó en la palca de Petri de cultivo de tejido de

464

10 cm con una densidad celular de 5 x 10^5 células/placa. Después de la incubación a 37°C durante toda la noche con un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, se transfectó ARNsi de la nectina-2 o ARNsd no silenciado como control negativo por una modificación del procedimiento del EJEMPLO DE REFERENCIA 5, seguido por incubación a 37°C durante 24 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Se extrajo el ARN total de estas células usando el kit de ARN Mini Total (QIAGEN). Mediante aproximadamente 100 ng del ARN total como molde, se llevó a cabo la transcripción reversa usando los reactivos de transcripción reversa TaqMan (Applied Biosystems). El nivel de expresión del ARNm del gen de la nectina-2α se midió por PCR cuantitativa PCR, en la cual se usó como molde al ADNc en una cantidad correspondiente a 10 ng cuando se calculó como el ARN total y la solución de reacción estaba compuesta de 10 μl por la adición de 5 μl de la mezcla TaqMan Universal PCR Master(Applied Biosystems), 500 nM de cada cebador 1 (SEQ ID NO: 9) y cebador 2 (SEQ ID NO: 10) y 100 nM de sonda TaqMan 1 marcada con FAM (SEQ ID NO: 11). A la inversa, el nivel de expresión del ARNm del gen de la nectina-2δ se midió por PCR cuantitativa, en la cual se usó como molde al ADNc en una cantidad correspondiente a 10 ng cuando se calculó como el ARN total y la solución de reacción estaba compuesta de 10 μl por la adición de 5 μl de la mezcla TaqMan Universal PCR Master(Applied Biosystems), 500 nM de cada cebador 3 (SEQ ID NO: 12) y cebador 4 (SEQ ID NO: 13) y 100 nM de sonda TaqMan 1 marcada con FAM (SEQ ID NO: 14). La PCR se realizó por la reacción a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. El nivel de expresión del ARNm para β-actina contenida en la misma cantidad del ADNc molde mediado mediante reactivos de control de β-actina TaqMan

(Applied Biosystems) y usado como estándar interno.

Los niveles de expresión de ARNm de nectina-2α y nectina-2δ disminuyeron en 69% y 73%, respectivamente, en el grupo del ARNsi de la nectina-2, cuando se comparó con el grupo de ARNsd no silenciado usado como control negativo, lo cual indica que hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.001$). Estos resultados indican que la reducción de los niveles de expresión del ARNm para los genes de la nectina-2α y nectina-2δ fue inducida por el ARNsi de la nectina-2 .

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

Expresión mejorada del ARNm de la nectina-2 en tejido canceroso humano

Se compararon los niveles de expresión del ARNm para el gen de nectina-2 entre los tejidos cancerosos humanos y tejidos normales humanos y se estudiaron por PCR cuantitativa. Se usaron como moldes para la PCR, ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 1 (Cosmo Bio), ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 2 (Cosmo Bio), Panel de pares de ADNc apareados de colon humano (BD Biosciences), Panel de pares de ADNc apareados de pulmón (BD Biosciences) y Panel de pares de ADNc apareados de ovario humano (BD Biosciences). El nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2α se midió de la siguiente manera: se usó 1 µl de ADNc como molde y la solución de reacción estaba compuesta de 15 µl por el agregado de 7.5 µl de mezcla TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems), 500 nM de cada cebador 1 (SEQ ID NO: 9) y cebador 2 (SEQ ID NO: 10) y 100 nM de sonda TaqMan marcada con FAM 1 (SEQ ID NO: 11). El nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2δ se determinó de la siguiente manera: se usó 1 µl de ADNc como molde y la solución de reacción estaba compuesta de 15 µl por el agregado de 7.5 µl de mezcla TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems), 500 nM de

cada cebador 3 (SEQ ID NO: 12) y cebador 4 (SEQ ID NO: 13) y 100 nM de sonda TaqMan marcada con FAM 1 (SEQ ID NO: 14), excepto que la cantidad del molde fue de 0.2 µl para ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 1 (Cosmo Bio) y ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 2 (Cosmo Bio). La PCR se llevó a cabo por la reacción a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. A la inversa, se midió el nivel de expresión del ARNm para β-actina contenida en la misma cantidad del ADNc molde y se usó como el estándar interno. Como resultado, el nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2α, aumentó en los tejidos cancerosos de 3 donantes incluidos en el ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 1 (Cosmo Bio) en 1.1 veces, 10 veces y 4.3 veces, respectivamente, y aumentó en los tejidos cancerosos de 3 donantes incluidos en el ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 2 (Cosmo Bio) en 12 veces, 3.5 veces y 21 veces, respectivamente, cuando se compara con el nivel de expresión de los tejidos normales humanos. Asimismo, el nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2α aumentó en tejidos cancerosos de 5 donantes que incluían el Panel de pares de ADNc apareados de colon humano (BD Biosciences) en 4.8 veces, 3.2 veces, 2.6 veces, 1.9 veces y 1.8 veces, respectivamente, en comparación con tejidos normales; en tejidos cancerosos de 5 donantes que incluían el Panel de pares de ADNc apareados de pulmón humano (BD Biosciences) en 11 veces, 3.7 veces, 4.1 veces, 3.2 veces y 1.3 veces, respectivamente, en comparación con tejidos normales; en tejidos cancerosos de 4 de 5 donantes que incluían el Panel de pares de ADNc apareados de ovario humano (BD Biosciences) en 1.3 veces, 1.8 veces, 2.6 veces y 2.4 veces, respectivamente, en comparación con tejidos normales. El nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2δ aumentó en

tejidos cancerosos de 2 de 3 donantes incluidos en el ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 1 (Cosmo Bio), el cual fue 1.1 veces y 5.3 veces, respectivamente, y en tejidos cancerosos de 2 de 3 donantes incluidos en el ADNc de tumor de mamas CeHAT-SD 2 (Cosmo Bio), el cual fue 2.0 veces y 2.5 veces, respectivamente, en comparación con el nivel de expresión en tejidos normales. Asimismo, se halló que el nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2δ en tejidos cancerosos en 3 de 5 donantes incluidos en el Panel de pares de ADNc apareados de colon humano (BD Biosciences) es de 1.3 veces, 1.8 veces y 1.5 veces, respectivamente, en comparación con tejidos normales, en tejidos cancerosos de 4 de 5 donantes incluidos en el Panel de pares de ADNc apareados de pulmón humano (BD Biosciences) es de 4.8 veces, 3.7 veces, 1.1 veces y 1.3 veces, respectivamente, en comparación con tejidos normales y en tejidos cancerosos en 4 de 5 donantes incluidos en el Panel de pares de ADNc apareados de ovario humano (BD Biosciences) es de 4.2 veces, 2.1 veces, 2.4 veces y 4.2 veces, respectivamente. A partir de estos resultados, se confirmó que el ARNm para el gen de la nectina-2α y gen de la nectina-2δ se sobreexpresa en tejidos cancerosos en comparación con tejidos normales.

EJEMPLO DE REFERENCIA 9

Comparación del nivel de expresión del ARNm del gen de la nectina-2 en la línea de célula cancerosa humana

Línea celular de osteosarcoma Saos-2; líneas celulares de tumores de cerebro SK-N-MC, SK-N-AS, SK-N-BE, SK-N-DZ, SK-N-FI, SK-N-SH, D341 Med, Daoy, DBTRG-05MG, U-118 MG, U-87 MG, CCF-STTG1 y SW 1088; líneas de células cancerosa de mamas HCC1937, ZR-75-1, AU565, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3, BT474, MDA-MB-435s, MDA-MB-436, MDA-MB-468, MDA-MB-175VII y T-47D; líneas de células cancerosas de colon Caco-2, COLO 201,

COLO 205, COLO 320DM, DLD-1, HCT-15, HCT-8, HT-29, LoVo, LS180, LS123, LS174T, NCI-H548, NCI-SNU-C1, SK-CO-1, SW 403, SW 48, SW 480, SW 620, SW 837, SW 948, HCT 116 y WiDr; líneas de células cancerosas de pulmón no pequeñas A549, NCI-H23, NCI-H226, NCI-H358, NCI-H460, NCI-H522, NCI-H661, NCI-H810, NCI-H1155, NCI-H1299, NCI-H1395, NCI-H1435, NCI-H1581, NCI-H1651, NCI-H1703, NCI-H1793, NCI-H2073, NCI-H2085, NCI-H2106, NCI-H2228, NCI-H2342, NCI-H2347, SK-LU-1, NCI-H2122, SK-MES-1 y NCI-H292; líneas de células cancerosas de pulmón pequeñas NCI-H187, NCI-H378, NCI-H526, NCI-H889, NCI-H1417, NCI-H1672, NCI-H1836, NCI-H1963, NCI-H2227, NCI-N417 y SHP-77; líneas de células cancerosas de ovario ES-2, Caov-3, MDAH2774, NIH:OVCAR3, OV-90, SK-OV-3, TOV-112D y TOV-21G; líneas de células cancerosas de próstata DU 145 y LNCaP; líneas de células de retinoblastoma humano WERI-Rb-1 y Y79, líneas de células cancerosas testiculares Cates-1B (todas compradas en ATCC); líneas de células cancerosas de colon COCM1; líneas de células cancerosas de pulmón no pequeñas VMRC-LCD y líneas de células cancerosas de próstata PC3 (todas compradas en Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)) se cultivaron, respectivamente, de acuerdo con el protocolo de cultivo recomendado por ATCC o JCRB. El ARN total se preparó a partir de las células cultivadas mediante el kit de ARN RNeasy Mini Total (QIAGEN). Usando este ARN total como molde, se realizó la transcripción reversa para preparar el ADNc. Usando este ADNc como molde, se llevó a cabo la PCR cuantitativa para medir el nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2.

El nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2 se cuantificó por le procedimiento descrito en el EJEMPLO DE REFERENCIA 2, usando como molde el ADNc obtenido a partir de 5 ng del ARN total descrito anteriormente. A la inversa, se midió el

nivel de expresión de un gen para β-actina contenida en la misma cantidad del ADNc molde y se usó como estándar interno.

Los niveles de expresión relativa obtenidos por la estandarización del nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2α o el gen de la nectina-2δ con el nivel de expresión del ARNm para el gen de la β-actina se muestran en [TABLA 1]. Los resultados revelan que el nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2α fue 1% o superior en dos cepas de todas las líneas de células cancerosas bajo investigación y el nivel de expresión del ARNm para el gen de la nectina-2δ fue 1% o superior en las 12 cepas de las líneas de células cancerosas, cuando se compararon con el nivel de expresión del ARNm de la β-actina.

470

TABLA 1

Nombre de cél	Nectina -2 α	Nectina -2 δ	Nombre de cél	Nectina 2 α	Nectina -2 δ	Nombre de cél	Nectina -2 α	Nectina -2 δ
Saos-2	0.04	0.10	HCT-8	0.36	1.44	NCI-H1155	0.06	0.06
CCF-STTG1	0.19	0.39	HT-29	0.35	1.93	NCI-H1299	0.57	0.82
SW 1088	0.17	0.11	LoVo	0.16	0.46	NCI-H1581	0.19	0.61
DBTRG-05MG	0.08	0.18	LS 180	0.17	0.36	NCI-H2106	0.05	0.13
U-118 MG	0.26	0.08	LS123	0.29	0.90	NCI-H187	0.00	0.01
U-87 MG	0.13	0.11	LS174T	0.08	0.44	NCI-H378	0.06	0.11
D341 Med	0.11	0.09	NCI-H548	1.11	2.07	NCI-H526	0.26	0.41
Daoy	0.13	0.11	NCI-SNU-C 1	0.19	0.30	NCI-H889	0.07	0.19
SK-N-AS	0.06	0.04	SK-CO-1	0.57	1.35	NCI-H1417	0.08	0.20
SK-N-BE	0.03	0.04	SW 403	0.12	0.49	NCI-H1672	0.07	0.51
SK-N-DZ	0.03	0.03	SW 48	0.21	0.22	NCI-H1836	0.12	0.27
SK-N-FI	0.12	0.17	SW 480	0.14	0.26	NCI-H1963	0.04	0.05
SK-N-SH	0.09	0.19	SW 620	0.10	0.38	NCI-H2227	0.12	0.36
SK-N-MC	0.10	0.09	SW 837	0.36	1.27	NCI-N417	0.00	0.00
AU565	0.05	0.13	SW 948	0.56	1.19	SHP-77	0.10	0.33
MCF-7	0.08	0.68	WiDr	0.21	1.92	NCI-H226	0.04	0.26
MDA-MB-231	0.08	0.11	A549	0.24	0.25	NCI-H1703	0.30	0.48
SK-BR-3	0.31	0.65	NCI-H23	0.15	0.24	NCI-H2122	0.02	0.17
BT474	0.19	0.58	NCI-H358	0.12	0.46	SK-MES-1	0.04	0.12
HCC1937	0.15	0.29	NCI-H522	0.20	0.18	NCI-H292	0.00	1.03
MDA-MB-435 s	0.08	0.12	NCI-H1395	0.16	0.39	Caov-3	0.08	0.30
ZR-75-1	0.63	1.57	NCI-H1435	0.40	0.46	MDAH2774	0.12	0.17
MDA-MB-436	0.08	0.15	NCI-H1651	0.07	0.21	NIH:OVCAR3	0.17	0.43
MDA-MB-468	0.04	0.26	NCI-H1793	0.13	0.25	OV-90	1.09	5.06
MDA-MB-175 VII	0.03	0.12	NCI-H2073	0.15	0.34	SK-OV-3	0.32	0.72
T-47D	0.08	0.40	NCI-H2085	0.20	0.34	TOV-112D	0.46	0.45
COCM1	0.22	0.77	NCI-H2228	0.34	0.44	TOV-21G	0.24	0.25
Caco-2	0.37	0.99	NCI-H2342	0.64	2.45	ES-2	0.20	0.28
COLO 201	0.16	0.40	NCI-H2347	0.05	0.12	DU 145	0.14	0.60
COLO 205	0.23	0.63	SK-LU-1	0.04	0.10	LNCaP	0.29	0.60
COLO 320DM	0.15	0.24	VMRC-LCD	0.12	0.10	PC3	0.14	0.24
DLD-1	0.35	1.26	NCI-H460	0.12	0.15	Y79	0.11	0.19
HCT 116	0.40	0.71	NCI-H661	0.13	0.44	WERI-Rb-1	0.25	0.54
HCT-15	0.43	0.76	NCI-H810	0.09	0.20	Cates-1B	0.16	0.18

EJEMPLO DE REFERENCIA 10

Preparación del anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 por inmunización con ADNc de la nectina-2δ

La preparación del anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 por inmunización con ADN mediante la pistola génica se encargó a Genovac (Nosan Corporation). Se incorporó un vector

para la expresión en la célula animal en el que el ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3) estaba cubierto con micropartículas por el método descrito en la bibliografía de la patente (WO 00/29442) presentada por Genovac, con el cual se inmunizaron dos conejos mediante una pistola génica. Se recogió sangre para ensayo de la vena de la oreja. Después que se confirmó una titulación del anticuerpo aumentado en el suero, se recogió sangre por medio de la arteria de la carótida bajo anestesia para obtener 127 ml y 115 m, respectivamente.

Estos antisueros se diluyeron en PBS 2 veces y se centrifugaron. El sobrenadante se aplicó en una columna de antígeno preparada por la inmovilización de la nectina-2ED-proteína FLAG al HiTrap NHS-HP activado (Amersham Biosciences). Después del lavado con PBS, la columna se eluyó con glicina 0.1 M-HCl (pH 3) que contiene NaCl 0.15 M. El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M-HCl (pH 8) y luego se dializó contra PBS a 4°C durante toda la noche para purificar y obtener anticuerpos policlonales de conejo anti-nectina-2. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-nectina-2 obtenidos en la presente memoria se denominaron N2-R1 y N2-R2, respectivamente.

EJEMPLO DE REFERENCIA 11

Nivel de expresión de la proteína de la nectina-2 de las líneas de células cancerosas humanas

El nivel de expresión de la proteína de la nectina-2 de las líneas de células cancerosas humanas se analizó por citometría de flujo. Las líneas de células cancerosas humanas NCI-H1703, HT-29, OV-90, SKBR-3, SK-OV-3, NCI-H2342, TOV-112D, NCI-H2122, NCI-H292, Capan-2, MDA-MB-231, BxPC-3, HCT-8, SK-N-DZ, Caov-3, DU 145, A549, Caco-2, WiDr, ZR-75-1, HCT-15, NCI-

H1299, NCI-H2228 y BT474 (todas compradas en ATCC) se cultivaron, respectivamente, de acuerdo con el procedimiento recomendado por ATCC. La suspensión de células se preparó a razón de 1 x 10^6/ml mediante un regulador Stain (BD Biosciences), respectivamente. El anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 (N2-R2) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 10 se agregó a la suspensión celular con una concentración final de 3 μg/ml, que reaccionó a 4°C durante una hora. De modo similar, se agregó IgG de conejo no inmune (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en una concentración final de 3 μg/ml, el cual se usó como control negativo. Después de que esta suspensión celular se centrifugó, las células se lavaron con regulador Stain y se agregó anticuerpo IgG anti-conejo marcado con Alexa488 (Invitrogen) a la misma con una concentración final de 10 μg/ml, el cual se hizo reaccionar a 4°C durante una hora. Otra vez, las células se lavaron con regulador Stain y se proporcionaron al FACScan (Becton Dickinson) para medir el nivel de expresión de proteína de la nectina-2 en las células respectivas. Una proporción del valor medio de las intensidades de fluorescencia para las células N2-R2 teñidas al valor medio de las intensidades de fluorescencia del control negativo para cada línea celular se muestra en la [TABLA 2]. Los resultados revelan que la proteína de la nectina-2 estaba altamente expresada en las líneas de células cancerosas humanas de varias clases de cáncer tal como cáncer de pulmón, cáncer de mamas, cáncer de ovario, etc.

TABLA 2

Nombre cél	Relación	Nombre cél	Relación
NCI-H1703	72.5	HCT-8	48.8
HT-29	65.5	SK-N-DZ	6.0
OV-90	133.4	Caov-3	28.4
SKBR-3	61.6	DU 145	17.9
SK-OV-3	65.0	A549	16.9
NCI-H2342	62.1	Caco-2	50.5
TOV-112D	44.1	WDr	50.0
NCI-H2122	28.1	ZR-75-1	25.5
NCI-H292	10.6	HCT-15	25.9
Capan-2	83.6	NCI-H1299	36.9
MDA-MB-231	17.0	NCI-H2228	20.9
BxPC-3	46.6	BT474	42.0

EJEMPLO DE REFERENCIA 12

Construcción del vector de expresión de la célula animal para la nectina-2 recombinante del dominio extracelular–proteína FLAG

Usando como molde del vector de expresión en la célula animal (pADNc3,1(+)-Nectina-2δ) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4, se realizó la PCR por el uso del cebador 33 (SEQ ID NO: 29) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y cebador 34 (SEQ ID NO: 30) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-2δ, 2.5 U del ADN polimerasa PfuUltra Hotstart (STRATAGENE), 0.2 μM de cada cebador 33 (SEQ ID NO: 29) y cebador 34 (SEQ ID NO: 30), 200 μM de los dNTP y 5 μL de 10 x Pfu Ultra Regulador (STRATAGENE), el cual se preparó con 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 2

minutos y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 15 segundos, seguido por la reacción a 72°C durante 10 minutos. Después, el producto de PCR se purificó con el kit de purificación PCR (QIAGEN). El producto purificado luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. De modo similar, el pCMV-Tag4 (STRATAGENE) también se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Cada fragmento de ADN se purificó mediante el gel Wizard SV y PCR Clean-Up System (Promega). Los dos fragmentos se ligaron mediante Ligation High (TOYOBO). El plásmido obtenido se transfectó a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) y se incubó para la selección en el medio de agar LB que contenía canamicina. Como resultado del análisis de secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pCMV-Tag4-nectina-2ED-FLAG que tiene la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 32) que codifican la nectina-2ED-proteína FLAG (SEQ ID NO: 31) con una marca FLAG en el término C del dominio extracelular (secuencias de aminoácidos 1 a 361 de la nectina-2δ representada por la SEQ ID NO: 3) de la proteína de la nectina-2δ.

EJEMPLO DE REFERENCIA 13

Preparación de la nectina-2ED-proteína FLAG recombinante

La nectina-2ED-proteína FLAG codificada por el vector de expresión de la célula animal (pCMV-Tag4-nectina-2ED-FLAG) preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 12 se preparó mediante el sistema de expresión FreeStile293 (Invitrogen). Específicamente, el vector de expresión de la célula animal pCMV-Tag4-nectina-2ED-FLAG se transfectó a la línea celular 293F que usa 293 Fectina (Invitrogen), seguido por el cultivo celular con agitación centrífuga a 37°C durante 3 días en un flujo gaseoso de

dióxido de carbono al 8%. La suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de 0.45 µm. El filtrado se aplicó en una columna de anticuerpo anti-FLAG (Sigma), que había sido equilibrada con solución salina regulada con fosfato (PBS). Después del lavado de la columna con PBS, la nectina-2ED-proteína FLAG se eluyó con PBS que contiene 0.1 mg/ml del péptido FLAG. Después de que la fracción eluida se concentró por ultrafiltración mediante Vivaspin (VIVA SCIENCE), el péptido FLAG contaminado se eliminó por medio de una columna de filtración de gel PD-10 (Amersham Biosciences, cuyo nombre se cambió a GE Healthcare Biosciences,) equilibrada con PBS y concentró otra vez para adquirir la nectina-2ED-proteína FLAG recombinante con alta pureza.

EJEMPLO DE REFERENCIA 14

Preparación del anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2

El anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 se preparó usando la nectina-2ED-proteína FLAG recombinante preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 13 como inmunógeno. Se mezclaron una solución de PBS de la nectina-2ED-proteína FLAG y adyuvante completo de Freund en volúmenes iguales. Mediante la emulsión preparada de este modo tres conejos domésticos (conejo blanco Japonés, hembra, 3 kg) se inmunizaron con 0.1 mg/animal de la nectina-2ED-proteína FLAG por vía subcutánea e intracutánea en el lomo del animal. Para la segunda y posterior inmunización, la emulsión de la proteína se preparó del mismo modo empleando adyuvante de Freund incompleto y refuerzo y se repitió 7 veces cada 2 semanas.

Antes de la inmunización y una semana después del cuarto y sexto refuerzo, se recogió la sangre para el examen a través de la vena de la oreja. Un aumento de la titulación del anticuerpo en suero se confirmó por ELISA mediante una inmunoplaca recubierta

con la nectina-2ED-proteína FLAG. Una semana después del último refuerzo, se recogió sangre de tres conejos de la arteria de la carótida bajo anestesia para adquirir el antisuero de 78.9 ml, 78.2 ml y 78.8 ml, respectivamente.

Estos anti-sueros se diluyeron en PBS 2 veces y centrifugaron. El sobrenadante se aplicó en una columna del antígeno preparada por inmovilización de la nectina-2ED-proteína FLAG al HiTrap NHS-HP activada (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió a GE Healthcare Bio-sciences). Después del lavado con PBS, la columna se eluyó con glicina 0.1 M-HCl (pH 3) que contiene NaCl 0.15 M. El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M-HCl (pH 8) y luego se dializó contra PBS a 4°C durante toda la noche para adquirir anticuerpos policlonales de conejo anti-nectina-2 (N2-No. 1, N2-No. 2 y N2-No. 3).

EJEMPLO DE REFERENCIA 15

Construcción del vector de expresión de célula animal para nectina-2 dominio extracelular-proteína Fc

(1) Clonación del gen de IgG1 humana-fragmento Fc

Usando ADNc Marathon-Ready derivado del bazo humano (BD BIOSCIENCES) como molde se realizó la PCR mediante el cebador 33 (SEQ ID NO: 33) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 34 (SEQ ID NO: 34) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 µl del ADNc descrito anteriormente, 1 U de ADN polimerasa Pfu Turbo Hotstart (STRATAGENE), 1 µM de cada cebador 33 (SEQ ID NO: 33) y cebador 34 (SEQ ID NO: 34), 200 µM de los dNTP y 10 µl de 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar 20 µl totales. La PCR se realizó por reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos,

60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos. Después, el producto de PCR se purificó con el kit de purificación de PCR (QIAGEN). El producto purificado luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. El pADNc3,1(+) (Invitrogen) también se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Estos productos se purificaron con el kit de purificación de PCR. Los dos fragmentos de ADN se ligaron mediante un kit de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio) y luego se transfectaron a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en el medio LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis secuencial de clones de genes individuales recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-hFc que porta la secuencia de ADNc que codifica la región Fc de la IgG1 humana.

(2) Construcción del vector de expresión de la proteína quimérica de nectina-2 del dominio extracelular-Fc humana

Usando el pADNc3,1(+)-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4 como molde, se realizó la PCR por medio del cebador 35 (SEQ ID NO: 35) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y el cebador 36 (SEQ ID NO: 36) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pADNc3,1 (+)-Nectina-2δ, 2.5 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart, 0.2 μM de cada cebador 35 (SEQ ID NO: 35) y cebador 36 (SEQ ID NO: 36), 200 μM de los dNTP y 10 μl de 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar los 20 μl totales. Se llevó a cabo la PCR por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 35 veces el ciclo ajustado para incluir a 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos y 30 segundos. El producto de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa, se purificó

478

mediante el kit de extracción en gel (QIAGEN) y se digirió con enzimas de restricción HindIII y EcoRI. De modo similar, el pADNc3,1 (+)-hFc también se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 y luego se transfectaron a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal (pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc) que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 38) que codifica la proteína fusionada (SEQ ID NO: 37) del dominio extracelular de la proteína de la nectina-2δ (1era-350 de la secuencia de aminoácidos de la nectina-2δ representada por la SEQ ID NO: 3) a la región Fc de la IgG1 humana.

EJEMPLO DE REFERENCIA 16

Preparación de nectina-2ED-proteína de Fc recombinante

La nectina-2ED-proteína de hFc codificada por el vector de expresión en la célula animal (pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15 se preparó mediante el sistema de expresión FreeStile293 (Invitrogen). Específicamente, se transfectó el pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc a la línea celular 293F empleando 293 Fectina (Invitrogen), seguido por cultivo con agitación centrífuga a 37°C durante 3 días en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 8%. La suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante del cultivo resultante se filtró mediante un filtro de 0.22 μm y el filtrado se aplicó en una columna de Proteína A Sefarosa FF (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió por GE Healthcare Bio-sciences) equilibrada con PBS. Después de lavar la columna con PBS, se realizó la elución con glicina 0.1 M-HCl (pH 3.5) que contiene NaCl 0.15 M y el eluido se

neutralizó inmediatamente con Tris 1 M-HCl (pH 8). Después de que la fracción eluida de nectina-2ED-hFc se dializó contra PBS a 4°C durante toda la noche, la fracción se concentró por ultrafiltración mediante un Amicon Ultra15 30MWCO (MILLIPORE) para obtener la proteína de la nectina-2ED-Fc recombinante.

EJEMPLO DE REFERENCIA 17

Preparación del anticuerpo policlonal de conejo anti-Nectina-2 mediante el antígeno peptídico

Sobre la base de las secuencias de aminoácidos de la proteína de la nectina-2α (SEQ ID NO: 1) y proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3), se sintetizaron los siguientes 3 péptidos (péptidos 1 - 3) que consisten en 15 aminoácidos.

Secuencia de aminoácidos del péptido 1

[Cys-Lys-Met-Gly-Pro-Ser-Phe-Pro-Ser-Pro-Lys-Pro-Gly-Ser-Glu (SEQ ID NO: 39)] es una secuencia donde el residuo de Cys se agrega a las secuencias de aminoácidos 88-101 de la proteína de nectina-2α (SEQ ID NO: 1) y la proteína de nectina-2δ (SEQ ID NO: 3) en su extremo N-terminal.

Secuencia de aminoácidos del péptido 2

[Arg-Glu-Thr-Pro-Arg-Ala-Ser-Pro-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Leu-Cys (SEQ ID NO: 40)] es una secuencia donde se agrega un residuo Cys a la secuencia de aminoácidos 347-360 de la proteína de nectina-2α (SEQ ID NO: 1) en su extremo C-terminal.

Secuencia de aminoácidos del péptido 3

[Cys-Thr-Leu-Gly-Ala-Ser-Glu-His-Ser-Pro-Leu-Lys-Thr-Pro-Tyr (SEQ ID NO: 41)] es una secuencia donde se agrega un residuo Cys a la secuencia de aminoácidos 426-439 de la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3) en su extremo N-terminal.

Cada uno del péptido 1, el péptido 2 y el péptido 3 descritos anteriormente se sintetizaron químicamente unidos a maleimida de la hemocianina de la lapa californiana (KLH) (Pierce) como una

480

proteína transportadora, que se usó como un inmunógeno. Se usaron conejos macho KBL: JW (de 11 semanas, Kitayama Labes) como animal para la inmunización. Una emulsión compuesta de un inmunógeno anterior y adyuvante de Freund completo (Difco) se usó para la inmunización primaria y una emulsión compuesta del inmunógeno anterior y adyuvante de Freund incompleto (Difco) se usó para la segunda y posterior inmunización. Estas emulsiones se inyectaron por vía subcutánea en el lomo cada una como 0.5 mg de proteína 4 veces en total, cada 2 semanas. En el día 52 después de la inmunización primaria, se recogió sangre de la arteria de la carótida bajo anestesia y se obtuvo el suero de 70 ml , 66 ml o 72 ml del conejo inmunizado con el péptido 1, péptido 2 o péptido 3 respectivamente. La fracción de inmunoglobulina se concentró a partir del suero obtenido de este modo por salazón con sulfato de amonio y se purificó por una columna de afinidad de proteína A (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió por GE Healthcare Bio-sciences) para dar la fracción del anticuerpo IgG. El anticuerpo IgG así obtenido se aplicó a una columna inmovilizada con el antígeno, en la cual el péptido se acopló a una columna de Sefarosa 4B activada con tiol (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió por GE Healthcare) por medio del residuo Cys. Después de que la columna se lavó con PBS, el anticuerpo especifico del péptido se eluyó mediante PBS que contiene urea 8M. Estos eluidos se dializaron contra PBS para eliminar la urea, seguido la ultraconcentración y esterilización por filtrado. De este modo, se obtuvieron los anticuerpos policlonales de conejo anti-nectina-2 (AS-2704, AS-2705 y AS-2706) contra los péptidos 1, 2 y 3.

EJEMPLO DE REFERENCIA 18

Establecimiento de una línea de células NS0 que expresa en forma estable la nectina-2δ de longitud completa recombinante.

Se estableció la línea de células NS0 que expresa en forma estable la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3). Para obtener el vector de expresión en la célula animal pEE12,4-Nectina-2δ, el pADNc3,1(+)-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4 se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. Asimismo, el vector de expresión en la célula animal pEE12,4 (Lonza Biologics) se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y SmaI. Estos productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se escindieron los fragmentos para purificar con el kit de extracción en gel MinElute (QIAGEN). Los dos fragmentos de ADN se ligaron mediante Ligation High (TOYOBO), los cuales luego se transfectaron a Competent High DH5α (TOYOBO) e incubaron para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. La colonia cultivada de Escherichia coli se incubó en un medio LB que contenía ampicilina y las células se recogieron por centrifugación. El plásmido se preparó a partir de las células recuperadas de este modo mediante el kit QIAfilter Plasmid Maxi (QIAGEN). Después de que el plásmido se digirió con la enzima de restricción EcoRI, se confirmó por electroforesis en gel de agarosa la inserción del gen de nectina-2δ. De este modo se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pEE12,4-Nectina-2δ que tiene la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 4) que codifica la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3). Mediante el Gene Pulser (Bio-Rad), 40 μg del pEE12,4-Nectina-2δ linealizado por la digestión con la enzima de restricción (PvuI) se transfectó (250V, 400 μF) a las células NS0 (2×10^7). Las células se resuspendieron en medio DMEM (JRH) suplementado con 10% de FBS dializado (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM y se incubó en placas de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 96 pocillos a razón de 8,000 células/50 μl por pocillo en 16 placas a 2,000 células/50 μl por pocillo en 20 placas y a 400 conteos/50 μl por pocillo en 40 placas. Después de

482

la incubación a 37°C durante 24 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 8%, se agregaron 150 μL de medio DMEM de selección de GS (JRH) suplementado con 10% de FBS dializado y suplemento GS (JRH) a cada pocillo. La incubación continuó a 37°C durante 3 a 4 semanas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 8%. La colonia cultivada en el medio de selección mencionado anteriormente se incubó en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 24 pocillos. El ARN total se extrajo de las células cultivadas empleando el kit RNeasy 96 (QIAGEN). Se llevó a cabo la PCR cuantitativa usando el kit de reactivos de la mezcla maestra para PCR de un paso Taiman (Applied Biosystems) para seleccionar la línea celular con alta expresión del ARNm de la nectina-2δ. El ARN total, 100 ng, se usó como molde y la solución de reacción para la PCR cuantitativa estaba compuesta de 50 μl por agregado de 25 μl de 2X Master Mix (Applied Biosystems), 1.25 μl de 40X MultiScribe (Applied Biosystems), 50 nM de cada cebador 42 (SEQ ID NO: 42) y cebador 43 (SEQ ID NO: 43) y 50 nM de sonda TaqMan marcada con FAM 3 (SEQ ID NO: 44). La PCR se realizó por la reacción a 48°C durante 30 minutos y 95°C durante 10 minutos y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Como resultado, se seleccionaron y obtuvieron 12 cepas de células NS0 con alta expresión de ARNm para el gen de la nectina-2δ.

Los niveles de expresión de la proteína de la nectina-2δ en estas 12 cepas se compararon por citometría de flujo empleando anticuerpo policlonal de conejo del péptido de anti-nectina-2 (AS-2704) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 17 y entre ellos, se seleccionó y adquirió la línea celular NS0 (#2-75) que expresa en forma elevada la proteína de la nectina-2δ.

EJEMPLO DE REFERENCIA 19

Establecimiento de una línea de células FM3A que expresa en forma estable la nectina-2δ de longitud completa recombinante.

Se estableció la línea de células FM3A que expresa en forma estable la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3). Para obtener el vector de expresión en la célula animal pEF1-Nectina-2δ, el pADNc3,1(+)-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4 se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. Asimismo, el vector de expresión en la célula animal pEF1/myc-His A (Invitrogen) se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. Estos productos se purificaron con el kit de purificación de PCR Kit (QIAGEN) y los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio), los cuales luego se transfectaron a Competent High DH5α (TOYOBO) e incubaron para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. La colonia cultivada de Escherichia coli se incubó en un medio LB que contenía ampicilina y las células se recogieron por centrifugación. El plásmido se preparó a partir de las células recuperadas de este modo mediante el kit QIAprep Turbo Miniprep (QIAGEN). Después de que el plásmido se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV, se confirmó la inserción del gen de nectina-2δ por electroforesis en gel de agarosa, y de este modo se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pEF1-Nectina-2δ que tiene la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 4) que codifica la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3).

Mediante el Gene Pulser (Bio-Rad), 40 μg del pEF1-Nectina-2δ se transfectó (350V, 950 μF) a las células FM3A (1 x 10^7. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS (Invitrogen) e incubado a 37°C durante 18 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Las células transfectadas con el gen se resuspendieron en medio

484

RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y 1 mg/ml de Geneticina (Invitrogen), y se colocaron en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 96 pocillos, por pocillo, a razón de 1,000 células/200 μl y 100 células/200 μl/pocillo en 20 placas. El cultivo continuó a 37°C durante 1a 2 semanas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. La colonia cultivada en el medio de selección anteriormente mencionado se incubó otra vez en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 24 pocillos. El ARN total se extrajo de las células cultivadas empleando el kit RNeasy 96 (QIAGEN). Se llevó a cabo la PCR cuantitativa usando el kit de reactivos de la mezcla master para PCR de un paso Taqman (Applied Biosystems) para seleccionar la línea celular con alta expresión del ARNm de la nectina-2δ. El ARN total, 100 ng, se usó como molde y la solución de reacción para la PCR cuantitativa estaba compuesta de 50 μL por agregado de 25 μl de 2X Master Mix (Applied Biosystems), 1.25 μl de 40X MultiScribe (Applied Biosystems), 50 nM de cada cebador 1(SEQ ID NO: 9) y cebador 2 (SEQ ID NO: 10) y 50 nM de sonda TaqMan marcada con FAM 1 (SEQ ID NO: 11). La PCR se realizó por la reacción a 48°C durante 30 minutos y 95°C durante 10 minutos y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Como resultado, se seleccionaron y obtuvieron 7 cepas de células FM3A con alta expresión de ARNm para el gen de la nectina-2δ.

Los niveles de expresión de la proteína de la nectina-2δ en estas 7 cepas se compararon por citometría de flujo empleando anticuerpo policlonal de conejo del péptido de anti-nectina-2 (AS-2704) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 17 y entre ellos, se seleccionaron y adquirieron las líneas celulares de FM3A (#58, #60) que expresan en forma elevada la proteína de la nectina-2δ. Además, estas líneas celulares se resuspendieron en el

medio de selección descrito anteriormente y se incubaron en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 96 pocillos, por pocillo, a razón de 3 células/200 µl, 1 célula/200µl/pocillo y 0.3 células/200µl/pocillo, respectivamente. El cultivo continuó a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Se proporcionó una porción de la línea celular cultivada como una colonia única para la citometría de flujo descrita anteriormente y se seleccionó y obtuvo el clon (#60-6) que muestra un alto nivel de expresión de la proteína de nectina-2δ.

EJEMPLO DE REFERENCIA 20

Establecimiento de una línea de células CHO-K1 que expresa en forma estable la nectina-2δ de longitud completa recombinante

Se estableció la línea de células CHO-K1 que expresa en forma estable la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3). El vector de expresión en la célula animal de la nectina-2δ (pEE12,4-Nectina-2δ) construido en el EJEMPLO DE REFERENCIA 18 se linealizó por digestión con la enzima de restricción Pvul, y 40 µg del vector linealizado se transfectaron a las células CHO-K1 (1 x 10^7) usando un Gene Pulser. Las células se resuspendieron en medio DMEM (JRH) suplementado con 10% de FBS dializado (Invitrogen)y suplemento GS (JRH) y se incubó en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 96 pocillos a razón de 2.500 células/50µl/pocillo por pocillo en las 40 placas. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, 150 µl del medio anteriormente mencionado, que contiene 33.3 µM o 66.6 µM MSX (ICN) se agregaron a las 20 placas, respectivamente. El cultivo de selección continuó a 37°C durante 3 a 4 semanas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. La colonia cultivada en el medio de selección descrito anteriormente se incubó en una placa de cultivo de tejido de extremo inferior plano de 24 pocillos para cultivar las

células. El ARN total se obtuvo a partir de las células mediante el kit RNeasy 96 (QIAGEN) y se llevó a cabo la transcripción reversa mediante el ARN como molde. Además se realizó la PCR cuantitativa usando este producto de reacción como molde y se seleccionaron los 60 clones superiores de mayor expresión de ARNm de nectina-2δ.

Los niveles de expresión de la proteína de la nectina-2δ de estos 60 clones se compararon por citometría de flujo usando anticuerpo policlonal de conejo del péptido de anti-nectina-2 (AS-2704) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 17 para seleccionar y obtener la línea celular CHO-K1 (43-2) de alta expresión de la proteína de la nectina-2δ.

EJEMPLO DE REFERENCIA 21

Construcción del vector de expresión en la célula animal para la nectina-3 recombinante del dominio extracelular-proteína de Fc

(1) Clonación del fragmento IgG2a-Fc de ratón

Se usa el ADNc Marathon-Ready ADNc derivado del bazo de ratón (BD Biosciences) como molde. La PCR se realizó por medio del cebador 45 (SEQ ID NO: 45) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 46 (SEQ ID NO: 46) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μl del ADNc anterior, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart (STRATAGENE), 1 μM del cebador 45 (SEQ ID NO: 45) y cebador 46 (SEQ ID NO: 46), 200 μM de los dNTP y 10 μL del 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos. Después, el producto de PCR se purificó con el kit de purificación PCR (QIAGEN). El producto luego se digirió con

las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. De modo similar, el pADNc3,1 (+) (Invitrogen) también se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio) y luego se transfectaron a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-mFc que porta una secuencia de ADNc que codifica la región Fc de la IgG2a de ratón.

(2) Construcción del vector de expresión de la proteína quimérica nectina-3 de dominio extracelular-Fc humana

Se usa el ADNc Marathon-Ready derivado de la línea celular cancerosa humana A549 (BD Biosciences) como molde, la PCR se realizó por medio del cebador 47 (SEQ ID NO: 47) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y el cebador 48 (SEQ ID NO: 48) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μL del ADNc anterior, 2.5 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart, 1 μM del cebador 47 (SEQ ID NO: 47) y cebador 48 (SEQ ID NO: 48), 200 μM de los dNTP y 25 μL de 2 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 35 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos. Después, el producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR. El producto purificado luego se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. De modo similar, el pADNc3,1(+)-hFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15 se digirió con las enzimas de restricción HindIII y

488

EcoRI. El producto de reacción se separó por electroforesis en gel de agarosa y se purificó mediante el kit de extracción en gel (QIAGEN). Los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 y luego se transfectaron a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-3ED-hFc que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 50) que codifica la proteína de fusión (SEQ ID NO: 49) del dominio extracelular (1era a 404 de la secuencia de aminoácidos de la nectina-3 representada por la SEQ ID NO: 5) de la proteína de la nectina-3 a la región del Fc de la IG1 humana.

(3) Construcción del vector de expresión de la proteína quimérica nectina-3 de dominio extracelular-Fc de ratón

El vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-3ED-hFc obtenido en (2) se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el ADN que codifica el dominio extracelular de la proteína de la nectina-3 se escindió y purificó con el kit de extracción en gel. De modo similar, el pADNc3,1(+)-mFc obtenido en (1) se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, los productos de la reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de ADN se escindió y purificó con el kit de extracción en gel. Los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2, los cuales luego se transfectaron a Escherichia coli TOP10 e incubaron para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli,

se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-3ED-mFc que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 52) que codifica la proteína fusionada (SEQ ID NO: 51) del dominio extracelular de la proteína de la nectina-3 (1era-404 de la secuencia de aminoácidos de la nectina-3 representada por la SEQ ID NO: 5) a la región del Fc de ratón.

EJEMPLO DE REFERENCIA 22

Preparación de la proteína de nectina-3ED-mFc recombinante

La proteína de la nectina-3ED-mFc codificada por el pADNc3,1(+)-Nectina-3ED-mFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 21 se preparó mediante el sistema de expresión FreeStile293 (Invitrogen). Específicamente, el pADNc3,1(+)-Nectina-3ED-mFc se transfectó a la línea celular 293F usando 293 Fectina (Invitrogen), seguido por cultivo con agitación centrífuga a 37°C durante 3 días en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 8%. La suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante del cultivo resultante se filtró mediante un filtro de 0.22 µm y el filtrado se aplicó en una columna de Proteína A - Sefarosa FF (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió por GE Healthcare Bio-sciences) equilibrada con PBS. Después de lavar la columna con PBS, la elución se realizó con glicina 0.1 M-HCl (pH 3.5) que contiene NaCl 0.15 M. el eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M-HCl (pH 8). Después de que la fracción de nectina-3ED-Fc eluida se dializó contra PBS a 4°C durante toda la noche, la fracción se concentró por ultrafiltración mediante el Amicon Ultra15 30MWCO (MILLIPORE) para obtener la proteína de la nectina-3ED-mFc recombinante.

EJEMPLO DE REFERENCIA 23

Purificación del anticuerpo policlonal de conejo anti-Nectina-2

Para reducir las reacciones no específicas de la tinción inmunohistoquímica (IHC), el anticuerpo policlonal de conejo anti-

nectina-2 N2-No. 2 preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 14 se aplicó en la columna de nectina-3ED-FLAG preparada por la inmovilización de la proteína de la nectina-3ED-FLAG preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 26 en HiTrap NHS-HP activada (GE Healthcare) para eliminar la fracción de anticuerpo unida a la marca FLAG. La fracción de anticuerpo policlonal de conejo de nectina-2 específico pasada a través de la columna se recuperó como N2-No. 2-2, en cual se usó para el examen IHC.

EJEMPLO DE REFERENCIA 24

Expresión aumentada de la proteína de la nectina-2 en tejidos cancerosos humanos

La expresión de la proteína de la nectina-2 en tejidos cancerosos humanos se examinó por IHC. Específicamente, una matriz de tejido de cáncer de mamas humano (Cybrdi), una matriz de tejido de cáncer de ovario humano (Cybrdi) y matriz de tejido normal humano (Biomax) se sometieron a un tratamiento de eliminación de parafina, se sumergieron en una solución de recuperación del antígeno (DAKO) y luego se trataron a 121°C durante 15 minutos en una autoclave. Después, estas matrices de tejidos se lavaron con agua, se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante 7.5 minutos y se lavaron con PBS, seguido por el bloqueo con suero de cabra (Vectastain) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de que se eliminó el suero de cabra, las matrices se hicieron reaccionar con un regulador del anticuerpo diluido (DAKO) que contiene 1 μg/ml de N2-No. 2-2 purificado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 23 a 4°C durante toda la noche. Las matrices se lavaron con PBS y luego reaccionaron con ENVISION+ (DAKO) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después del lavado otra vez con PBS, se agregó una solución de sustrato DAB (Merck) que contiene peróxido de hidrógeno al 0.01% a las matrices de tejido, y se

491

hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos. A partir de entonces, las matrices se lavaron con agua y se sumergieron en hematoxilina durante un minuto seguido por un tratamiento de deshidratación. La observación microscópica de los tejidos tomados de cada matriz revelaron que la expresión de la proteína de la nectina-2 estaba aumentada en forma significativa en los tejidos cancerosos en las tasas mostradas en las TABLAS 2A y 2B.

TABLA 2A

Tejidos de mama

Clasificación	**Tasa positiva**
Carcinoma infiltrante ductal	89% (16/18)
Carcinoma ductal	100% (7/7)
Carcinoma infiltrante lobular	100% (9/9)
Carcinoma infiltrante medular	50% (3/6)
Adenocarcinoma mucinoso	71% (5/7)
Enfermedad de Paget	100% (7/7)
Mamas normales	0% (0/5)

TABLA 2B

Tejidos ováricos

Clasificación		**Tasa Positiva**
Epitelial	Carcinoma seroso	55% (22/40)
	Carcinoma granular	100% (3/3)

Clasificación		Tasa Positiva
	Carcinoma de células claras	50% (1/2)
	Carcinoma endometrioide	0% (0/1)
	Carcinoma mucinoso	25% (1/4)
	Tumor de Brenner	100% (1/1)
Germinoma		0% (0/4)
Carcinoma de células de la teca		100% (1/1)
Carcinoma metastático		17% (1/6)
Ovario normal		0% (0/3)

EJEMPLO DE REFERENCIA 25

Construcción del vector de expresión en la célula animal para la proteína de la nectina-3 del dominio extracelular-FLAG recombinante

Para preparar el vector de expresión en la célula animal de la proteína de la nectina-3 del dominio extracelular-FLAG recombinante, se construyó primero un vector al cual se podría agregar a la secuencia con la marca FLAG. Específicamente, dos ADN sintéticos, es decir, FLAG-FSALNOT (SEQ ID NO: 53) o FLAG-RSALNOT (SEQ ID NO: 54), cuyos extremos 5' estaban fosforilados se diluyeron en TE (Tris que contiene EDTA-HCl (pH 8)) para llegar a 50 μM respectivamente, se mezclaron en volúmenes iguales, se calentaron a 95°C durante 10 minutos y luego gradualmente se enfriaron para el apareamiento. Después un vector de expresión en la célula animal pCI-neo (Promega) se

digirió con las enzimas de restricción NheI y NotI y los productos de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y el fragmento del vector se extrajo con el kit de extracción con gel (QIAGEN). El ADN sintético apareado descrito anteriormente se mezcló con esta pCI-neo tratado con la enzima de restricción y la mezcla se sometió al ligamiento usando Ligation High (TOYOBO) para construir el vector de expresión en la célula animal pCI-FLAG adicionado que contenía la secuencia con la marca FLAG.

Después, usando el pADNc3,1(+)-Nectina-3ED-hFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 21 como molde, se realizó la PCR por medio del cebador 55 (SEQ ID NO: 55) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SalI y el cebador 56 (SEQ ID NO: 56) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NheI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta del pADNc3,1 (+)-Nectina-3ED-hFc usado como molde, 2.5 U de ADN polimerasa Pyrobest (Takara Bio), 0.5 µM de cada cebador 55 (SEQ ID NO: 55) y cebador 56 (SEQ ID NO: 56), 200 µM de los dNTP y 5 µl del 10 x GC Regulador I (TaKaRa Bio) para preparar los 50 µl totales. La PCR se realizó por la reacción a 94°C durante 2 minutos y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto y 30 segundos, seguido por la reacción a 68°C durante 2 minutos. Después, el producto de PCR se purificó mediante el kit de extracción en gel (QIAGEN) y luego se digirió con las enzimas de restricción SalI y NheI. De modo similar, el pCI-FLAG descrito anteriormente se digirió con las enzimas de restricción SalI y NheI. Después de que los dos fragmentos de ADN se purificaron mediante el kit de purificación de PCR, los dos fragmentos de ADN se ligaron mediante Ligation High (TOYOBO). El producto obtenido se transfectó a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la

incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene ampicilina. Como resultado del análisis de secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli produjeron el vector de expresión en la célula animal pCI-Nectina-3ED-FLAG que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 58) que codifica la proteína de la nectina-3ED-FLAG (SEQ ID NO: 57), la cual era la secuencia de aminoácidos N terminal 404 de la proteína de la nectina-3 (SEQ ID NO: 5) marcada con FLAG en el extremo C-terminal.

EJEMPLO DE REFERENCIA 26

Preparación de la proteína de la nectina-3ED-FLAG recombinante

La proteína de la nectina-3ED-FLAG codificada por el vector de expresión en la célula animal (pCI-Nectina-3ED-FLAG) construida en el EJEMPLO DE REFERENCIA 25 se obtuvo mediante el sistema de expresión FreeStile293 (Invitrogen). Específicamente, el vector de expresión en la célula animal pCI-Nectina-3ED-FLAG se transfectó a la línea celular 293F usando 293 Fectina (Invitrogen), seguido por el cultivo con agitación centrífuga a 37°C durante 3 días en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 8%. La suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante del cultivo resultante se filtró mediante un filtro de 0:45 µm y el filtrado se aplicó a una columna de anticuerpo anti-FLAG (Sigma) equilibrada con Tris 0.1 M-HCl (pH 7.5) que contiene NaCl 0.3 M. Después del lavado de la columna con Tris 0.1 M-HCl (pH 7.5) que contiene NaCl 0.3 M, la proteína de la nectina-3ED-FLAG se eluyó con el mismo regulador que contiene 0.1 mg/ml del péptido de FLAG. Después de la fracción eluida se concentró por ultrafiltración usando el Amicon Ultra 15 (30K MWCO) (Millipore), la fracción se aplicó a una columna de desalinización PD-10 (GE Healthcare Biosciences) equilibrada con PBS para eliminar el péptido de FLAG contaminado y se concentró otra vez para obtener la proteína de la

nectina-3ED-FLAG recombinante de alta pureza.

EJEMPLO DE REFERENCIA 27

Preparación del anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-3

Se preparó el anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-3 usando la proteína de la nectina-3ED-FLAG recombinante preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 26 como un inmunógeno. Se mezcló una solución de PBS de la proteína de la nectina-3ED-FLAG con adyuvante de Freund completo (Difco) en volúmenes iguales. Mediante la emulsión preparada de este modo, se inmunizaron dos conejos domésticos (conejo blanco Japonés, hembra, 3 kg) por vía subcutánea e intracutánea con la proteína de la nectina-3ED-FLAG a razón de 0.1 mg a cada animal en el lomo del animal. Para la segunda y posterior inmunización, la emulsión de la proteína también se preparó usando adyuvante de Freund incompleto (Difco) y el refuerzo se repitió 7 veces cada 2 semanas.

Antes de la inmunización y una semana después del cuarto y sexto refuerzo, se recogió sangre para examinar de la vena de la oreja. Un aumento en la titulación de anticuerpos en suero se confirmó por ELISA mediante una inmunoplaca recubierta con la proteína de la nectina-3ED-FLAG. Una semana después del último refuerzo, se recogió sangre de los dos conejos de la arteria de la carótida bajo anestesia para dar el antisuero de 78.9 ml y 78.8 ml, respectivamente.

Estos antisueros se diluyeron en PBS 2 veces y se centrifugaron. El sobrenadante se aplicó en una columna de antígeno preparada por inmovilización de la proteína de la nectina-3ED-FLAG en HiTrap NHS-HP activada (GE Healthcare Bio-sciences). Después de lavar con PBS, la columna se eluyó con glicina 0.1 M-HCl (pH 3) que contiene NaCl 0.15 M. El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M-HCl (pH 8) y luego se dializó contra PBS a 4°C durante toda la noche para obtener

496

anticuerpos policlonales de conejo anti-nectina-3 (N3-No. 1 y N3-No. 3).

EJEMPLO DE REFERENCIA 28

Producción en gran escala de anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano

Los once anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos usados para en ensayo *in vivo* de la actividad antitumoral se prepararon a partir de los hibridomas productores del anticuerpo (Nec1-803-2, Nec1-964-1, Nec1-303-2, Nec1-554-1, Nec1-1302-2, Nec1-769-2, Nec1-1305-1, Nec1-141-3, Nec1-209-2, Nec1-909-1 y Nec1-847-2). Un ejemplo típico del método de producción se describe a continuación. Después de expandir el cultivo de la línea celular del hibridoma descrita anteriormente a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5% en medio IH (medio de Dulbecco modificado por Iscove: Ham's F-12 = 1:1, MEM 0.1 mM solución de aminoácidos no esenciales, solución de piruvato de sodio 1 mM, solución de L-glutamina 2 mM; Invitrogen), conteniendo 10% FBS, Ultra bajo IgG (Introvagen), las células fueron posteriormente extendidas a un medio condicionado primario (medio IH: medio del hibridoma CD, solución de L-glutamina 8 mM = 1:1, Invitrogen), L-glutamina 8mM=1:1, Invitrogen) seguido por incubación durante un día. Éstas luego se expandieron con el medio para el cultivo principal (medio IH: medio del hibridoma CD, solución de L-glutamina 8 mM = 1:3, Invitrogen), seguido por la incubación durante 5 a 7 días en un matraz con agitación en flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5% a 37°C, o en un tanque de cultivo con agitación de columna de 50 litros de volumen, en condiciones de una concentración de oxígeno disuelto de 2 ppm, pH 7.0 y 40 rpm de número de rotaciones de agitación. En el último caso se agregó solución de glucosa y una solución de L-glutamina durante la incubación sobre la base del análisis de los

497

componentes del medio. El cultivo principal se terminó con una variabilidad celular de aproximadamente 50%. Después de la terminación del cultivo, se recogió el sobrenadante del cultivo por centrifugación (7.460 x g, 20 minutos).

Cada sobrenadante del hibridoma obtenido de este modo se concentró y aplicó en una membrana de ultrafiltración (membrana Hydrosart, peso molecular límite, 10,000; Sartorius AG) para el intercambio del regulador a regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0) que contiene NaCl 0.15 M, seguido por la centrifugación (14,300 x g, 20 minutos) para obtener el sobrenadante. El sobrenadante se microfiltró adicionalmente (Stericup HV, 0.45 μm; Millipore) para obtener el concentrado y éste se adsorbió en una columna de Proteína A Sefarosa (22 mm ID x 79 mm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0) que contiene NaCl 0.15 M. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de columna del mismo regulador, la fracción del anticuerpo adsorbida a la columna se eluyó por el paso de 20 volúmenes de columna del regulador de citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0). Inmediatamente desde entonces, la fracción se neutralizó por el agregado de 1/10 volumen del regulador de Tris 1 M-HCl (pH 9.0). Después, de concentrar el anticuerpo mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 30,000; Millipore), el concentrado se aplicó a una columna Superdex 200 (26 mm ID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con PBS y se eluyó con el mismo regulador para dar la fracción monomérica del anticuerpo. Después la fracción se pasó a través de una columna ActiClean ETox (25 mmID x 59 mm, Sterogene Bioseparations) para eliminar la endotoxina, seguido por la concentración en una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 10,000; Millipore) y el concentrado se filtró adicionalmente en forma aséptica (Millex GV, 0.22 μm; Millipore)

498

para dar la preparación del anticuerpo purificado.

Debido a que se halló que la fracción purificada del anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo del hibridoma Nec1-554-1 con la columna de Proteína A es en forma excepcional una mezcla de los anticuerpos activos e inactivos, la fracción de anticuerpo además se separó en una columna de intercambio catiónico para recolectar la fracción activa. Específicamente, la fracción de anticuerpo purificada por Proteína A descrita anteriormente se diluyó 3 veces con regulador de acetato de sodio 20 mM (pH 5.0) a 2-3 veces y se adsorbió en una columna SP-5PW (21.5 mmID x 150 mm, Toso) equilibrada con regulador de acetato de sodio 20 mM (pH 5.0) que contiene NaCl 100 mM. Después de lavar la columna con aproximadamente 2 volúmenes de columna de regulador de acetato de sodio (pH 5.0) que contiene NaCl 100 mM, la fracción del anticuerpo activo y la fracción de anticuerpo inactivo se eluyeron separadamente con un gradiente lineal de NaCl de concentración 100 mM a 300 mM durante 70 minutos y se recolectó la fracción activa del anticuerpo (SP3). El eluido del anticuerpo obtenido de este modo se concentró mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 30,000; Millipore), se aplicó a una columna Superdex 200 (26 mmID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con PBS y se eluyó con el mismos regulador para dar la fracción monomérica del anticuerpo. Después se pasó a través de una columna ActiClean ETox (25 mm ID x 59 mm, Sterogene Bioseparations) equilibrada con PBS para eliminar la endotoxina, seguido por la concentración mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 10,000; Millipore) y el concentrado se filtró adicionalmente en forma aséptica (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) para dar el anticuerpo purificado. El anticuerpo purificado se denominó Nec1-554-1 SP3.

499

Todos los anticuerpos purificados obtenidos de esta manera demostraron una pureza del 95% o superior en SDS-PAGE y HPLC con filtración en gel usando una columna Superdex 200. Se halló que el contenido de endotoxina de la preparación de anticuerpo es de 0.1 EU/mg o menos de anticuerpo por los análisis Endospecy ES-24S Set (Seikagaku Corp.) y Toxicolor DIA Set (Seikagaku Corp.)

EJEMPLO DE REFERENCIA 29

Construcción de los vectores de expresión en célula animal para nectina-1, nectina-3, nectina-4 y Nec1-5

El gen de la nectina-1 humana se obtuvo por la realización de la PCR. Usando el ADNc Marathon-Ready (Takara Bio) de cerebro humano como molde, por medio del cebador 59 (SEQ ID NO: 59) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV y el cebador 60 (SEQ ID NO: 60) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Xhol. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μL de la solución de ADNc usada anteriormente como molde, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart (STRATAGENE), 1 μM del cebador 59 (SEQ ID NO: 59) y cebador 60 (SEQ ID NO: 60), 200 μM de los dNTP y 2 μL del regulador Pfu Ultra 10x (STRATAGENE) para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos. El producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR (QIAGEN) y luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRV y Xhol. De modo similar, el pCMV-Tag4 (STRATAGEN) se digirió con las enzimas de restricción EcoRV y Xhol. Estos fragmentos de ADN se purificaron, respectivamente, mediante el kit de purificación de PCR y los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio).

La mezcla de reacción se transfectó a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía canamicina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pCMV-Tag4-Nectina-1 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 61) que codifica la proteína de la nectina-1 (SEQ ID NO: 62).

El gen de la nectina-3 humana se obtuvo por la realización de la PCR. Usando el ADNc de placenta humano contenido en los paneles de ADNc del tejido múltiple MTC (Takara Bio) como molde, el cebador 47 (SEQ ID NO: 47) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y cebador 63 (SEQ ID NO: 63) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μl de la solución de ADNc anterior, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart, 1 μM del cebador 47 (SEQ ID NO: 47) y cebador 63 (SEQ ID NO: 63), 200 μM de los dNTP y 10 μl del regulador I 2x GC (TaKaRa Bio) para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos. El producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR y luego se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRV. De modo similar, el pADNc3,1(+) (Invitrogen) se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRV. Estos fragmentos de ADN se purificaron, respectivamente, mediante el kit de purificación de la PCR, y los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2. la mezcla de reacción se transfectó a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contiene

ampicilina. Se analizó la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli para dar el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-3 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 6) que codifica la proteína de la nectina-3 (SEQ ID NO: 5). Usando el ADNc3,1(+)-Nectina-3 obtenido en la presente memoria descriptiva como un molde, se realizó la PCR por medio del cebador 47 (SEQ ID NO: 47) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y el cebador 64 (SEQ ID NO: 64) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 100 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-3, 2.5 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart, 1 μM de cada uno del cebador 47 (SEQ ID NO: 47) y cebador 64 (SEQ ID NO: 64), 200 μM de los dNTP y 25 μL del Regulador I 2x GC para preparar 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir a 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2 minutos. El producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR y luego se digirió con las enzimas de restricción HindIII y XhoI. De modo similar, el pCMV-Tag4 se digirió con las enzimas de restricción HindIII y XhoI. Estos fragmentos de ADN se purificaron, respectivamente, mediante el kit de purificación de PCR MinElute (QIAGEN), y los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2. La mezcla de reacción se transfectó a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía canamicina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pCMV-Tag4-Nectina-3 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 6) que codifica la proteína de la

nectina-3 (SEQ ID NO: 5).

El gen de la nectina-4 humana se obtuvo por la realización de la PCR, usando un ADNc Marathon-Ready (Takara Bio) de pulmón humano, como molde, el cebador 65 (SEQ ID NO: 65) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 66 (SEQ ID NO: 66) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 µl de la solución de ADNc anterior, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart, 1 µM de cada cebador 65 XP06 (SEQ ID NO: 65) y cebador 66 (SEQ ID NO: 66), 200 µM de los dNTP y 2 µL del Regulador 10x Pfu Ultra para preparar 20 µl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos. Después, el producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR y luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. De modo similar, el pCMV-Tag4 se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante el kit de purificación de PCR y el fragmento de ADN insertado y el fragmento del vector se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2. La mezcla de reacción se transfectó a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía canamicina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pCMV-Tag4-Nectina-4 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 67) que codifica la proteína de la nectina-4 (SEQ ID NO: 68).

El gen de Nec1-5 humano se obtuvo por la realización de la PCR. Usando un ADNc Marathon-Ready (Takara Bio) de intestino delgado humano, como molde, el cebador 69 (SEQ ID NO: 69)

marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y el cebador 70 (SEQ ID NO: 70) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SalI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 µl de la solución del ADNc anterior, 1 U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart, 1 µM de cada cebador 69 (SEQ ID NO: 69) y cebador 70 (SEQ ID NO: 70), 200 µM de los dNTP y 2 µL de Regulador 10x Pfu Ultra para preparar 20 µl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir a 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 3 minutos. Después, el producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR y luego se ligó con el PCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). La mezcla de reacción se transfectó a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía canamicina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector de clonación pCR-BluntII-Nec1-5 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 72) que codifica la proteína Nec1-5 (SEQ ID NO: 71). El pCR-BluntII-Nec1-5 obtenido en la presente memoria descriptiva se digirió con las enzimas de restricción HindIII y SalI. De modo similar, el pCMV-Tag4 se digirió con las enzimas de restricción HindIII y SalI. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante el kit de purificación de PCR MinElute y los dos fragmentos se ligaron mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2. La mezcla de reacción se transfectó a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía canamicina. Se analizó la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli para dar el vector de expresión en la célula animal pCMV-Tag4-Nec1-5 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 72) que codifica la

504

proteína de Nec1- 5 (SEQ ID NO: 71).

EJEMPLO DE REFERENCIA 30

Construcción del vector de expresión en la célula animal de la variante de nectina-2 deficiente en el dominio de Ig1 o Ig2

El gen de la variante de la nectina-2 en la cual el dominio de Ig1 o dominio de Ig2 de la región extracelular de nectina-2 esta deficiente se obtuvo por el siguiente procedimiento. La PCR se realizó usando pADNc3,1(+)-Nectina-2δ obtenido del EJEMPLO DE REFERENCIA 4 usado como molde. En la reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-2δ descrito anteriormente, 1U de ADN polimerasa PfuTurbo Hotstart (STRATAGENE), 1 μM de cada cebador 5 (SEQ ID NO: 15) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 73 (SEQ ID NO: 73) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV para la variante deficiente en el dominio de Ig1 o el cebador 5 (SEQ ID NO: 15) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y cebador 74 (SEQ ID NO: 74) adicionado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV para la variante deficiente en el dominio de Ig2, 200 μM de los dNTP y 10 μl del Regulador I 2xGC (TaKaRa Bio), para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 1.5 minutos. El producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR (QIAGEN) y luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. De modo similar, el pADNc3,1 (+) (Invitrogen) se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. Estos fragmentos se purificaron mediante el kit de purificación de la PCR y se digirieron con las enzimas de restricción y después el fragmento del vector se ligó mediante el kit

505

de ligamiento de ADN ver. 2 (TaKaRa Bio), el producto de ligamiento se transfectó a Escherichia coli TOP10 (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía ampicilina para obtener los plásmidos pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg1-1 y pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg2-1 que tienen los respectivos fragmentos anteriores de PCR amplificados.

Después, se realizó la PCR mediante 10 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-2δ como molde y 1U de ADN polimerasa Pfu Turbo Hotstart, 1 μM de cada cebador 75 (SEQ ID NO: 75) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV y cebador 76 (SEQ ID NO: 76) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Xhol para la variante deficiente en el dominio de Ig1 o cebador 77 (SEQ ID NO: 77) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV y cebador 76 (SEQ ID NO: 76) marcado con la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Xhol para la variante deficiente en el dominio de Ig2, 200 μM de los dNTP y 10 μl el Regulador I 2xGC se usaron para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 1.5 minutos. Después, el producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR y luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRV y Xhol. De modo similar, los pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg1-1 y pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg2-1 construidos anteriormente se digirieron con las enzimas de restricción EcoRV y Xhol. Estos fragmentos se purificaron mediante el kit de purificación de PCR y el producto de la digestión de la enzima de restricción del producto de la PCR usando el cebador 75 (SEQ ID NO: 75) y cebador 76 (SEQ ID NO: 76) se ligó con el producto de la digestión de la enzima de restricción de pADNc3,1(+)-Nectina-

2Δlg1-1 mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2. Asimismo, el producto de la digestión de la enzima de restricción del producto de la PCR usando el cebador 77 (SEQ ID NO: 77) y cebador76 (SEQ ID NO: 76) se ligó con el producto de la digestión de la enzima de restricción de pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg2-1 mediante el kit de ligamiento de ADN ver. 2. Éstos se transfectaron a Escherichia coli TOP10, seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía ampicilina para dar el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg1 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 79) que codifica la proteína de la nectina-2 deficiente en el dominio de lg1 (SEQ ID NO: 78) y el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg2 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 81) que codifica la proteína de la nectina-2 deficiente en el dominio de lg2 (SEQ ID NO: 80).

EJEMPLO DE REFERENCIA 31

Clonación y secuenciación de bases del ADNc que codifican la nectina-2 derivada de mono cinomolgo

Un gen del mono cinomolgo se obtuvo de la siguiente manera. Una genoteca de ADNc se preparó por una reacción de transcripción reversa mediante los reactivos de transcripción reversa TaqMan (Applied Biosystems) y aproximadamente 1 μg del ARN total (UNITECH) preparado a partir los testículos del mono cinomolgo como molde) de acuerdo con el protocolo adjunto con el kit. Usando la genoteca de ADNc como molde, se realizó la PCR mediante el cebador 82 (SEQ ID NO: 82) y cebador 83 (SEQ ID NO: 83). En la reacción, la solución de reacción estaba compuesta del ADNc anterior correspondiente a aproximadamente 40 ng del ARN total, 1U de ADN polimerasa Pfu Turbo Hotstart (STRATAGENE), 1 μM de cada cebador 82 (SEQ ID NO: 82) y cebador 83 (SEQ ID NO: 83), 200 μM de los dNTP y 2 μL de Regulador 10x Pfu Ultra, para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 96°C

durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 96°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2.5 minutos. Después, usando este producto como molde, se realizó la PCR mediante el cebador 84 (SEQ ID NO: 84) y cebador 85 (SEQ ID NO: 85). En la reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 1 μl del producto de la PCR anterior, 1U de ADN polimerasa Pfu Turbo Hotstart, 1 μM de cada cebador 84 (SEQ ID NO: 84) y cebador 85 (SEQ ID NO: 85), 200 μM de los dNTP y 2 μL de Regulador 10 Pfu Ultra, para preparar 20 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 96°C durante 1 minuto y luego se repitió 40 veces el ciclo ajustado para incluir 96°C durante 20 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 2.5 minutos. Después, el producto de la PCR se purificó con un kit de purificación de PCR MinElute (QIAGEN) y se ligó con el pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). El producto de ligamiento se transfectó a la célula competente TOP10 de Escherichia coli (Invitrogen), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía canamicina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli, se obtuvo el vector pCR-BluntII-maNectina-2 que porta la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 87) que codifica la proteína de la nectina-2 de mono cinomolgo (SEQ ID NO: 86).

EJEMPLO DE REFERENCIA 32

Construcción del vector de expresión en célula animal para la nectina-2 de mono cinomolgo

Usando el pCR-BluntII-maNectina-2 que tiene el gen de la nectina-2 de mono cinomolgo preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 31 como molde, la PCR se realizó por medio del cebador 88 (SEQ ID NO: 88) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 89 (SEQ ID NO: 89) marcado con el sitio de reconocimiento de la

enzima de restricción XhoI. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pCR-BluntII-maNectina-2, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus (TOYOBO), 0.3 μM de cada cebador 88 (SEQ ID NO: 88) y cebador 89 (SEQ ID NO: 89), 200 μM de los dNTP y 5 μl de Regulador de PCR 10x (TOYOBO) para preparar 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego se repitió 35 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto y 30 segundos. Después, el producto de la PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR MinElute (QIAGEN) y luego se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, seguido por la purificaron con un kit de purificación de PCR MinElute (QIAGEN). De modo similar, el pADNc3,1(+) (Invitrogen) se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Después de la separación por electroforesis en agarosa, el fragmento del vector se purificó mediante el kit de extracción en gel MinElute (QIAGEN). El fragmento de ADN insertado y el fragmento del vector obtenido de este modo se ligaron mediante Ligation High (TOYOBO) y luego se transfectaron a Escherichia coli competente en alto DH5α (TOYOBO), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía ampicilina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-maNectina-2 que tiene la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 87) que codifica la proteína de la nectina-2 de mono cinomolgo (SEQ ID NO: 86).

EJEMPLO DE REFERENCIA 33

Construcción del vector de expresión en la célula animal para la nectina-2 humana en el cual se introdujo una mutación tipo mono cinomolgo

Usando el vector de expresión en la célula animal

SEQ

pADNc3,1(+)-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4 como molde, se realizó la PCR por medio del cebador 90 (SEQ ID NO: 90) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y el par del cebador 91 (SEQ ID NO: 91), o el par del cebador 92 (SEQ ID NO: 92) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y cebador 93 (SEQ ID NO: 93). En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-2δ, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus (TOYOBO), 0.3 μM de cada cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 91 (SEQ ID NO: 91) o cebador 92 (SEQ ID NO: 92) y cebador 93 (SEQ ID NO: 93), 200 μM de los dNTP y 5 μL de regulador de PCR 10x (TOYOBO) para preparar 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego se repitió 35 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Después, los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación de PCR MinElute (QIAGEN). Después, usando como molde la mezcla de los productos de la PCR obtenidos de este modo, se llevó a cabo la PCR mediante el cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 92 (SEQ ID NO: 92). En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 5 μL de cada uno de los productos de la PCR purificados descritos anteriormente, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus, 0.3 μM de cada cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 92 (SEQ ID NO: 92), 200 μM de los dNTP y 5 μl de regulador PCR 10x, de la cual se prepararon 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego se repitió 20 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Después, el producto de la PCR se purificó mediante un kit de purificación de PCR MinElute y luego se digirió con las enzimas de

S10.

restricción HindIII y EcoRI, seguido por la purificación con un kit de purificación de PCR MinElute (QIAGEN). De modo similar, el pADNc3,1(+) (Invitrogen) se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Después de la separación por electroforesis en agarosa, el fragmento del vector objetivo se purificó mediante el kit de extracción en gel (QIAGEN). El fragmento de ADN insertado y el fragmento del vector obtenido de este modo se ligaron mediante Ligation High (TOYOBO) y luego se transfectaron a Escherichia coli competente en alto DH5α (TOYOBO), seguido por la incubación para la selección en un medio de agar LB que contenía ampicilina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli se obtuvo el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2 (AN77-78PD) que tiene una secuencia de ADNc que codifica AN77-78PD con una mutación de Ala a Pro en la posición 77 y Asn a Asp en la posición 78 de la proteína de la nectina-2δ humana (SEQ ID NO: 3).

Después, usando el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4 como molde , se llevó a cabo la PCR mediante el par del cebador 90 (SEQ ID NO: 90) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y cebador 94 (SEQ ID NO: 94), o el par del cebador 92 (SEQ ID NO: 2) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y cebador 95 (SEQ ID NO: 95). En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-2δ, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus, 0.3 μM de cada cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 94 (SEQ ID NO: 94) o cebador 92 (SEQ ID NO: 92) y cebador 95 (SEQ ID NO: 95), 200 μM de los dNTP y 5 μl de regulador PCR 10x, de la cual se prepararon 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego

S11

se repitió 35 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Después, los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación de PCR MinElute. Usando como molde la mezcla de los productos de la PCR obtenidos de esta manera, se llevó a cabo la PCR mediante el cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 92 (SEQ ID NO: 92). En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 5 μl de cada uno de los productos de la PCR purificados descritos anteriormente, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus, 0.3 μM de cada cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 92 (SEQ ID NO: 92), 200 μM de los dNTP y 5 μl del regulador PCR 10x, de la cual se prepararon 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego se repitió 20 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. De aquí en adelante, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para dar el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2 (G113R) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína G113R con una mutación de Gly a Arg en la posición 113 de la proteína de la nectina-2δ (SEQ ID NO: 3).

Después, usando como molde el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 4, se realizó la PCR mediante el par del cebador 90 (SEQ ID NO: 90) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII y cebador 96 (SEQ ID NO: 96), o el par del cebador 92 (SEQ ID NO: 2) marcado con el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI y el cebador 97 (SEQ ID NO: 97). En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 10 ng de pADNc3,1(+)-Nectina-2δ, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus, 0.3 μM de cada cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 96 (SEQ ID NO: 96) o cebador 96 (SEQ ID NO: 96) y

512

cebador 97 (SEQ ID NO: 97), 200 μM de los dNTP y 5 μl del regulador PCR 10x, de la cual se prepararon 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego se repitió 35 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Después, los productos de la PCR se purificaron mediante un kit de purificación de PCR MinElute. Usando como molde la mezcla de los productos de la PCR obtenidos de esta manera, se llevó a cabo la PCR mediante el cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 92 (SEQ ID NO: 92). En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 5 μl de cada uno de los productos de la PCR purificados descritos anteriormente, 1 U de ADN polimerasa KOD-Plus, 0.3 μM de cada cebador 90 (SEQ ID NO: 90) y cebador 92 (SEQ ID NO: 92), 200 μM de los dNTP y 5 μl del regulador PCR 10x, de la cual se prepararon 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 3 minutos y luego se repitió 20 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. De aquí en adelante, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para dar el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-Nectina-2 (H128R) que tiene la secuencia de ADNc que codifica la proteína H128R con una mutación de His a Arg en la posición 128 de la proteína de la nectina-2δ humana (SEQ ID NO: 3).

EJEMPLO DE REFERENCIA 34

Construcción de los vectores de expresión en células de animales para la proteína de la nectina-2ED-Fc humana con una sola sustitución de aminoácidos en el dominio de Ig1

Mediante el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15 como un molde, se mutó la secuencia de ADN que codifica 26 residuos de aminoácidos del dominio de Ig1 de la

S13

nectina-2 se mutó para reemplazar cada uno de los residuos de aminoácidos con un residuo de alanina o residuo de glicina, por el uso del kit de mutagénesis dirigida al sitio Change XL (Stratagene). En la reacción, la solución de reacción compuesta de 7 µl del plásmido de expresión descrito anteriormente (20 ng/µl), 35 µl de regulador 10x, 7 µl de la mezcla de dNTP, 21 µl de Quick Solution y 7 µl de ADN polimerasa Pfu Turbo (2.5 U/µl) para preparar el volumen total de 300 µl por el agregado de agua destilada al mismo. Una alícuota de 9 µl de la solución se dispensó separadamente en 26 tubos para PCR, a cada una las cuales se agregó una combinación 0.5 µl de cebadores (3.7 µM) de los cebadores respectivos: cebador Q37A (SEQ ID NO: 98) y cebador Q37A R (SEQ ID NO: 99), cebador P40G (SEQ ID NO: 100) y cebador P40G R (SEQ ID NO: 101), cebador Q45A (SEQ ID NO: 102) y cebador Q45A R (SEQ ID NO: 103), cebador H55A (SEQ ID NO: 104) y cebador H55A R (SEQ ID NO: 105), cebador V60A (SEQ ID NO: 106) y cebador V60A R (SEQ ID NO: 107), cebador Y64A (SEQ ID NO: 108) y cebador Y64A R (SEQ ID NO: 109), cebador Q71A (SEQ ID NO: 110) y cebador Q71A R (SEQ ID NO: 111), cebador A75G (SEQ ID NO: 112) y cebador A75G R (SEQ ID NO: 113), cebador P76G (SEQ ID NO: 114) y cebador P76G R (SEQ ID NO: 115), cebador A77G (SEQ ID NO: 116) y cebador A77G R (SEQ ID NO: 117), cebador N78A (SEQ ID NO: 118) y cebador N78A R (SEQ ID NO: 119), cebador H79A (SEQ ID NO: 120) y cebador H79A R (SEQ ID NO: 121), cebador Q80A (SEQ ID NO: 122) y cebador Q80A R (SEQ ID NO: 123), cebador N81A (SEQ ID NO: 124) y cebador N81A R (SEQ ID NO: 125), cebador K88A (SEQ ID NO: 126) y cebador K88A R (SEQ ID NO: 127), cebador S95A (SEQ ID NO: 128) y cebador S95A R (SEQ ID NO: 129), cebador K109A (SEQ ID NO: 130) y cebador K109A R (SEQ ID NO: 131), cebador E117A (SEQ ID NO: 132) y cebador E117A R (SEQ ID NO: 133),

cebador D122A (SEQ ID NO: 134) y cebador D122A R (SEQ ID NO: 135), cebador H128A (SEQ ID NO: 136) y cebador H128A R (SEQ ID NO: 137), cebador N137A (SEQ ID NO: 138) y cebador N137A R (SEQ ID NO: 139), cebador F145A (SEQ ID NO: 140) y cebador F145A R (SEQ ID NO: 141), cebador K147A (SEQ ID NO: 142) y cebador K147A R (SEQ ID NO: 143), cebador V150A (SEQ ID NO: 144) y cebador V150A R (SEQ ID NO: 145), cebador M153A (SEQ ID NO: 146) y cebador M153A R (SEQ ID NO: 147), o , cebador T154A (SEQ ID NO: 148) y cebador T154A R (SEQ ID NO: 149). La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 18 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 50 segundos, 60°C durante 50 segundos y 68°C durante 7 minutos y 40 segundos, seguido por la reacción a 68°C durante 7 minutos. Después de la reacción, se agregó 1 μl de cada enzima de restricción DpnI (2U/μl) a los 26 tubos de la solución de PCR, seguido por su reacción a 37°C durante una hora. Estas mezclas de reacción, 2 μl, se transfirieron a 20 μl de células ultracompetentes de Escherichia coli XL10-Gold y se incubaron para la selección en un medio de agar LB que contenía ampicilina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli se obtuvieron los siguientes vectores de expresión respectivamente: el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q37A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína Q37A con una mutación de Gln a Ala en la posición 37 en la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(P40G) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína P40G con una mutación de Pro a Gly en la posición 40 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q45A) que tiene una

secuencia de ADNc que codifica la proteína Q45A con una mutación de Gln a Ala en la posición 45 en la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(H55A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína H55A con una mutación de His a Ala en la posición 55 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(V60A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína V60A con una mutación de Val a Ala en la posición 60 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Y64A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína Y64A con una mutación de Tyr a Ala en la posición 64 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q71A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína Q71A con una mutación de Gln a Ala en la posición 71 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(A75G) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína A75G con una mutación de Ala a Gly en la posición 75 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(P76G) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína P76G con una mutación de Pro a Gly en la posición 76 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(A77G) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína A77G con una mutación de Ala a Gly en la posición 77 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(N78A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína N78A con una mutación de Asn a Ala en la posición 78 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO:

S16

37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(H79A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína H79A con una mutación de His a Ala en la posición 79 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q80A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína Q80A con una mutación de Gln a Ala en la posición 80 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(N81A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína N81A con una mutación de Asn a Ala en la posición 81 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K88A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína K88A con una mutación de Lys a Ala en la posición 88 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(S95A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína S95A con una mutación de Ser a Ala en la posición 95 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K109A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína K109A con una mutación de Lys a Ala en la posición 109 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(E117A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína E117A con una mutación de Glu a Ala en la posición 117 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(D122A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína D122A con una mutación de Asp a Ala en la posición 122 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(H128A) que tiene una secuencia de

ADNc que codifica la proteína H128A con una mutación de His a Ala en la posición 128 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(N137A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína N137A con una mutación de Asn a Ala en la posición 137 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(F145A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína F145A con una mutación de Phe a Ala en la posición 145 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K147A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína K147A con una mutación de Lys a Ala en la posición 147 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(V150A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína V150A con una mutación de Val a Ala en la posición 150 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(M153A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína M153A con una mutación de Met a Ala en la posición 153 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(T154A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína T154A con una mutación de Thr a Ala en la posición 154 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37).

EJEMPLO DE REFERENCIA 35

Construcción del vector de expresión en la célula animal para la proteína de nectina-2ED-Fc humana con una sola sustitución de aminoácido en el dominio Ig2

Mediante el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15, se mutó la secuencia de ADN que codifica 13

residuos de aminoácidos del dominio de Ig2 de la nectina-2 para reemplazar cada uno de los residuos de aminoácidos con un residuo de alanina o residuo de glicina, por el uso del Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). En la reacción, la solución de reacción compuesta de 3.5 µl del plásmido de expresión descrito anteriormente, 17.5 µl de regulador 10x, 3.5 µl de la mezcla de dNTP, 21 µl de Quick Solution y 7 µl de ADN polimerasa Pfu Turbo (2.5 U/µl) para preparar el volumen total de 150 µl por el agregado de agua destilada al mismo. Una alícuota de 9 µl de la solución se dispensó separadamente en 13 tubos para PCR, a cada una las cuales se agregó una combinación 0.5 µl de cebadores (3.7 µM) de los cebadores respectivos: cebador Q165A (SEQ ID NO: 150) y cebador Q165A R (SEQ ID NO: 151), cebador K170A (SEQ ID NO: 152) y cebador K170A R (SEQ ID NO: 153), cebador F173A (SEQ ID NO: 154) y cebador F173A R (SEQ ID NO: 155), cebador P177G (SEQ ID NO: 156) y cebador P177G R (SEQ ID NO: 157), cebador I184A (SEQ ID NO: 158) y cebador I184A R (SEQ ID NO: 159), cebador K186A (SEQ ID NO: 160) y cebador K186A R (SEQ ID NO: 161), cebador L197A (SEQ ID NO: 162) y cebador L197A R (SEQ ID NO: 163), cebador W202A (SEQ ID NO: 164) y cebador W202A R (SEQ ID NO: 165), cebador E206A (SEQ ID NO: 166) y cebador E206A R (SEQ ID NO: 167), cebador T212A (SEQ ID NO: 168) y cebador T212A R (SEQ ID NO: 169), cebador T235A (SEQ ID NO: 170) y cebador T235A R (SEQ ID NO: 171), cebador K239A (SEQ ID NO: 172) y cebador K239A R (SEQ ID NO: 173), o , cebador A249G (SEQ ID NO: 174) y cebador A249G R (SEQ ID NO: 175). cebador Q37A (SEC

La PCR se realizó por la reacción a 95°C durante 1 minuto y luego se repitió 18 veces el ciclo ajustado para incluir 95°C durante 50 segundos, 60°C durante 50 segundos y 68°C durante 7 minutos y 40 segundos, seguido por la reacción a 68°C durante 7 minutos.

Después de la reacción, se agregó 1 µl de cada enzima de restricción DpnI (2U/µl) a los 13 tubos de la solución de PCR, seguido por su reacción a 37°C durante una hora. Estas mezclas de reacción, 2 µl, se transfirieron a 20 µl de células ultracompetentes de Escherichia coli XL10-Gold y se incubaron para la selección en un medio de agar LB que contenía ampicilina. Como resultado de la secuenciación de los clones del gen individual recuperados de la colonia cultivada de Escherichia coli se obtuvieron los siguientes vectores de expresión respectivamente: el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q165A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína Q165A con una mutación de Gln a Ala en la posición 165 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K170A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína K170A con una mutación de Lys a Ala en la posición 170 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(F173A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína F173A con una mutación de Phe a Ala en la posición 173 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(P177G) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína P177G con una mutación de Pro a Gly en la posición 177 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(I184A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína I184A con una mutación de Ile a Ala en la posición 184 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K186A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína K186A con una mutación de Lys a Ala en la posición 186 de la nectina-2ED-Fc(SEQ

ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(L197A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína L197A con una mutación de Leu a Ala en la posición 197 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(W202A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína W202A con una mutación de Trp a Ala en la posición 202 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(E206A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína E206A con una mutación de Glu a Ala en la posición 206 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(T212A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína T212A con una mutación de Thr a Ala en la posición 212 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(T235A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína T235A con una mutación de Thr a Ala en la posición 235 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K239A) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína K239A con una mutación de Lys a Ala en la posición 239 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37), el vector de expresión en la célula animal pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(A249G) que tiene una secuencia de ADNc que codifica la proteína A249G con una mutación de Ala a Gly en la posición 249 de la nectina-2ED-Fc(SEQ ID NO: 37).

EJEMPLO 1

Generación de anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos

Se inmunizaron cinco ratones KM (10 semanas, 12 semanas, machos, Kirin Brewery) con una emulsión preparada por la mezcla de al proteína de la nectina-2ED-Fc (1.6 mg/ml de solución de PBS)

S21

preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 16 o la proteína de nectina-2ED-FLAG (2 mg/ml de solución PBS) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 13 con adyuvante de Freund completo (Difco) en volúmenes iguales por vía subcutánea e intracutánea a razón de 50 μg cada/animal, respectivamente. Para la segunda y posterior inmunización, las emulsiones preparadas por la mezcla de estas proteínas de nectina-2 recombinantes del dominio extracelular y adyuvante de Freund incompleto (Difco) en volúmenes iguales también se administraron cada dos semanas como inmunización adicional.

También, la línea celular FM3A (#60-6) que expresa en forma estable nectina-2δ, la cual fue establecida en el EJEMPLO DE REFERENCIA 19, y la línea celular NS0 (#2-75) que expresa en forma estable a la nectina-2δ, la cual fue establecida en el EJEMPLO DE REFERENCIA 18, se cultivaron en un matraz, respectivamente. Las células se recuperaron por centrifugación (1,200 rpm x 5 minutos), y se resuspendieron en el medio RPMI1640 (Invitrogen) y luego se recuperaron por centrifugación (1,200 rpm x 5 minutos), tal procedimiento se repitió 3 veces para eliminar los componentes del suero. Las células respectivas recuperadas se resuspendieron en el medio RPMI1640 a razón de 5 x 10^7 células/ml, y una solución de mitomicina C (Wako Pure Chemical) en un medio RPMI1640 en una concentración final de 20 μg/ml se agregó a las células, seguido por la incubación a 37°C durante 30 minutos. Ambas líneas celulares tratadas con mitomicina C se lavaron del mismo modo 3 veces con 10 ml de PBS y luego se resuspendieron en PBS a razón de 2 x 10^7células/ml. La suspensión se inyectó por vía intraperitoneal a cada uno de los cinco ratones KM (10-12 semanas, machos) en forma repetida una vez cada semana como inmunización adicional.

Asimismo, se inmunizaron cada uno de los cinco ratones (12

S22

semanas, machos) con una emulsión preparada por la mezcla de la proteína de la nectina-2ED-Fc o la proteína de la nectina-2ED-FLAG con adyuvante de Freund completo (Difco) en volúmenes iguales por vía subcutánea e intracutánea a razón de 50 μg/animal, respectivamente. Una semana después de la primer inmunización, se administró la línea celular FM3A (# 60-6) que expresa la nectina-2δ tratada con mitomicina C por vía intraperitoneal a razón de 1 x 10^7 células /500 μl. Para la tercer inmunización, se administró una emulsión preparada por la mezcla de nectina-2ED-Fc, nectina-2ED-FLAG y adyuvante de Freund incompleto en volúmenes iguales por vía subcutánea e intracutánea a razón de 50 μg /animal y al mismo tiempo se inyectó la línea celular FM3A (# 60-6) que expresa la nectina-2δ tratada con mitomicina C por vía intraperitoneal a razón 1 x 10^7 células/cada 500 μl, por el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para el cuarto y subsiguiente refuerzo, se inyectó por vía intraperitoneal sólo la línea celular FM3A (# 60-6) que expresa la nectina-2δ tratada con mitomicina C razón 1 x 10^7 células/cada 500 μl, por el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Antes de la primer inmunización y una semana después de la tercer inmunización, se recogió sangre del fondo ocular de todos los ratones bajo anestesia con éter para preparar anticuerpos, y se determinó la titulación del anticuerpo del suero por la citometría de flujo que se describe a continuación. Es decir, las suspensiones celulares (PBS) de la línea celular CHO (#43-2) que expresa en forma estable la nectina-2δ, la cual fue establecida en el EJEMPLO DE REFERENCIA 20, y la línea celular similar a CHO dispensaron en forma separada en tubos de polipropileno a razón de 5 x 10^5 células por tubo, respectivamente y luego se eliminó el PBS por centrifugación (1,200 rpm x 5 minutos). Estos restos celulares se resuspendieron en 50 μl de cada uno de los antisuero de ratón

SL3.

diluidos 100 veces con PBS que contiene 1% de BSA y 10% de FBS, y se hicieron reaccionar en hielo en la oscuridad durante 30 minutos. Después se agregaron 200 μl de PBS a los restos celulares y la mezcla se centrifugó (1,200 rpm x 5 minutos), el sobrenadante se eliminó por aspiración. Los restos celulares se resuspendieron en 50 μl de una solución de IgG (H+L) anti-humana Alexa 488 (Invitrogen) diluida 100 veces con PBS que contiene 1% de BSA y 10% de FBS, y reaccionaron en hielo y en la oscuridad durante 30 minutos. Después la suspensión celular se lavó del mismo modo 3 veces con PBS, los restos celulares se resuspendieron en 200 μl de PBS. Se analizaron las intensidades de fluorescencia de las células respectivas con el citómetro de flujo MPL500 (BECKMAN COULTER) para preparar un gráfico que tiene una abscisa que representa la intensidad de fluorescencia y una ordenada que representa el recuento de células, por medio del cual se comparan las titulaciones de anticuerpos de los antisueros.

En los ratones KM en los que se confirmó un aumento suficiente de la titulación de anticuerpos del suero, los ratones inmunizados con nectina-2ED-Fc o nectina-2ED-FLAG se inyectaron en la vena de la cola con estos antígenos proteicos en una dosis de 10 μg cada/animal, y los ratones inmunizados con la línea celular que expresa en forma estable nectina-2δ se inyectaron por vía intraperitoneal a razón de 1 x 10^7 células como refuerzo final. Tres días después del refuerzo final, los ratones se sangraron hasta la muerte y se extirpó el bazo. Las células del bazo de ratón obtenidas se mezclaron en 5:1 con células de mieloma de ratón (P3X63Ag8U,1(P3U1)), que habían sido previamente adaptadas a un medio en el cual 1 vial de 8-azaguanina (Sigma) por 500 ml de 10% de FBS suplementado con medio Daigo T (una mezcla del medio de la mezcla de nutrientes F-12 (HAM) (Invitrogen) y el medio de Dulbecco modificado de Iscove

S24

(Invitrogen) en volúmenes iguales, se suplementó con solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen), piruvato de sodio (Invitrogen) y L-Glutamina (Invitrogen)), de este modo se origina la fusión mediante polietilenglicol (PEG) 1,500 (Roche Diagnostics). Las manipulaciones de fusión celular se realizaron de acuerdo con el manual adjunto. Las células después de la fusión se resuspendieron en el medio Daigo T suplementado con 10% de FBS y 10% de BM Condimed H1 (Roche Diagnostics), sembrado en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células de bazo/100 µl/pocillo y se incubaron a 37°C durante un día en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Posteriormente, se agregó un medio Daigo T (medio de selección HAT) suplementado con hipoxantina 0.1 mM, aminopterina 0.4 µM, timidina (HAT) 0.016 mM, BM Condimed H1 10% y FBS 10% a las mismas a razón de 100 µl/pocillo, seguido por la incubación adicional a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5% con el reemplazo dos veces de 3/4 del sobrenadante del cultivo con un medio de selección HAT fresco cada 3 días.

El sobrenadante del cultivo en el cual se observó crecimiento de la colonia durante los días 7 a 14 de la incubación se aplicó para un ELISA usando la línea celular CHO (#43-2) que expresa en forma estable nectina-2δ o la línea celular similar a CHO, por medio de la cual se detectó el hibridoma productor de anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos. En otras palabras, la línea celular CHO (#43-2) que expresa en forma estable nectina-2δ y la línea celular similar a CHO se incubaron en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos cargada con medio DMEM de selección GS suplementado con 10% de FBS dializado y suplemento GS. Después, el sobrenadante del cultivo, en el que cada línea celular se hizo confluente se eliminó por aspiración, 200 µl/pocillo de PBS(+) suplementado con 2% de FBS se agregaron a los mismos y

SLS.

se incubaron en hielo a la oscuridad durante una hora. Después el sobrenadante de cada pocillo se eliminó por aspiración, se agregaron 50 μl de cada pocillo del sobrenadante del cultivo del hibridoma y se hicieron reaccionar en hielo a la oscuridad durante 2 horas. Después la placa se lavó una vez con PBS(+) enfriado a 4°C, se agregó un conjugado de una cadena específica IgG anti-humana IgG (H+L) (GOAT) y peroxidasa (CALBIOCHEM) diluida a 3,000 veces con PBS(+) suplementado con 2% FBS por 100 μl de cada pocillo y se hizo reaccionar en hielo a la oscuridad durante 2 horas. Después la placa se lavó 3 veces con PBS(+) enfriado a 4°C, se agregó una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (sustrato TMB SureBlue Microwell; Kirkegaard & Perry Laboratories) por 100 μl de cada pocillo y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos para producir la formación de color. Por agregado de ácido sulfúrico 2N (Wako Pure Chemical) por 100 μl de cada pocillo, la reacción enzimático terminó. Se midió la absorbancia de cada pocillo (450 nm) mediante una placa lectora (Multiskan BICHROMATIC; Thermo Electron Co.) y las que muestran una absorbancia de 0.5 o más de la expresión de nectina-2 en la placa de la línea celular CHO y que muestra una absorbancia menor de menos de 0.3 de la placa de la línea celular similar a CHO se consideraron como pocillos positivos. Se seleccionaron entre ellos a los hibridomas productores de anticuerpo IgG, en los que se espera que la especificidad y afinidad antigénica sean particularmente altas. Estos hibridomas se resuspendieron en medio Daigo T suplementado con 10% de FBS y 10% de BM Condimed H1 y se sembró en una placa de cultivo de 96 pocillos a razón de 0.5 células/pocillo. Los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas, los cuales se confirmaron como monoclones por la observación microscópica, se identificaron de nuevo por el ELISA Cell descrito anteriormente para establecer los

clones del hibridoma productores del anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano. Los 256 hibridomas productores del anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano obtenidos de este modo se incubaron en matraces, respectivamente, cargados con 100 ml de medio Daigo T suplementado con 10% de FBS IgG Ultra low (Invitrogen), y los sobrenadantes del cultivo se centrifugaron (1,200 rpm x 5 minutos) para dar los sobrenadantes que contienen los anticuerpos monoclonales. Después se que agregaron 200 µl de Proteína A Sefarosa FF (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió por GE Healthcare Bio-sciences) equilibrada con PBS a estos sobrenadantes del cultivo, los anticuerpos se adsorbieron a los mismos mientras se agitaba suavemente durante toda la noche a 4°C. Este transportador de proteína A se recuperó por operación de la centrifuga y se lavó con PBS. Luego, la fracción de IgG se eluyó con 1.2 ml de glicina 0.1 M-HCl que contiene NaCl 0.3 M (pH 3.0). Después este eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M-HCl (pH 8.0), el regulador se reemplazó con PBS por ultraconcentración mediante una membrana de ultrafiltración (Vivaspin 6: peso molecular límite:10,000 Sartorius) el cual se usó en las siguientes caracterizaciones *in vitro* como preparación del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano.

EJEMPLO 2

Actividades de unión de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

Para las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos, se determinó el valor de EC_{50} de cada anticuerpo por la aplicaciones de diluciones de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 con PBS(+) suplementado con 2% en un ELISA Cell usando la línea celular CHO que expresa en forma estable nectina-2 que se muestra en el EJEMPLO 1 y preparando una curva de dependiente

de la concentración, las cuales se evaluaron en forma relativa. La especificidad antigénica de cada anticuerpo monoclonal se confirmó por comparación de una propiedad de unión de la placa de la línea celular CHO que expresa en forma estable nectina-2 y la propiedad de unión de la placa de la línea celular similar a CHO. Las EC_{50} de los respectivos anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos se muestran colectivamente en la TABLA 3.

EJEMPLO 3

Subclase de anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

La subclase de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos obtenidas en el EJEMPLO 1 se identificaron por el ELISA que se muestra a continuación. Seis anticuerpos (IgG_1 anti-humana, fragmento Fc (ratón), purificado; CALBIOCHEM, IgG_2 anti-humana, fragmento Fc (ratón), purificado; CALBIOCHEM, IgG_3 anti-humana de ratón; Zymed, Ms x Hu IgG_4 Fc; CHEMICON, IgM anti-humana de ratón monoclonal; Zymed, anticuerpo de cadena liviana kappa anti-humana de cabra b+f afinidad purificada; Bethil) capaz de reconocer específicamente la cadena H de la IgG_1 humana, IgG_2, IgG_3, IgG_4 y IgM y la cadena κ humana se diluyeron a una concentración de 2 μg/ml, respectivamente, en regulador de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 9.6). Cada dilución se agregó a una inmunoplaca de medio pocillo de 96 pocillos (Costar) a razón de 50 μl a cada pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Después que se eliminó la solución de reacción de cada pocillo, se agregaron 100 μL a cada pocillo de agua destilada que contiene 25% de Block Ace (DAINIPPON PHARMACEUTICALS) para efectuar el bloqueo a 4°C durante toda la noche.

La placa preparada de esta manera para ELISA se lavó dos veces con PBS que contiene Tween al 0.05%. A partir de entonces, cada anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano purificado y

S28

obtenido en el EJEMPLO 1 se diluyó a 1 μg/ml en agua destilada que contiene Block Ace al 10% y se agregaron 50 μl/pocillo de la dilución resultante a la placa, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de que esta placa se lavó 4 veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.05%, Anti-IgG+IgA+IgM (H+L), se agregó peroxidasa de rábano picante de cabra y humana (Zymed) diluida 5,000 veces en agua destilada a razón de 50 μl por cada pocillo, que luego reaccionaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó adicionalmente 6 veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.05%. Después de agregó la solución de TMB (sustrato de peroxidasa SureBlue Microwell TMB) a razón de 50 μl por cada pocillo, la placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 minutos para provocar la formación de color. Luego, se agregó ácido sulfúrico 2N (Wako Pure Chemical) a razón de 50 μl por cada pocillo para terminar la reacción enzimática. Se midió la absorbancia (450 nm) de cada placa mediante una placa lectora (Multiskan BICHROMATIC) y la subclase de cada anticuerpo se identificó a partir de la especificidad antigénica del anticuerpo inmovilizado en el pocillo que muestra una absorbancia significativamente superior a los otros. Los resultados se muestran en la TABLA 3A.

EJEMPLO 4

Agrupación de anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos sobre la base de los epítopes

Los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos obtenidos del EJEMPLO 1 se agruparon de acuerdo con la diferencia de sus epítopes de reconocimiento. Este proceso se muestra a continuación. Para realizar la reacción de inhibición competitiva entre los anticuerpos, 187 anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos de los anticuerpos obtenidos en el EJEMPLO 1 se biotinilaron. Es decir, 10 μg del anticuerpo

529

monoclonal anti-nectina-2 humano se agregaron a 50 µl de regulador WS unido a Biotin Labeling Kit-NH2 (Dojindo) y la mezcla se ultraconcentró casi a sequedad mediante un Microcon YM50 (MILLIPORE). Al residuo líquido, se agregaron secuencialmente en este orden, 50 µl de regulador de reacción unido a Biotin Labeling Kit-NH2 y una solución de 4 µl de reactivo NH2 Biotin en 50 µl de DMSO. La mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante 10 minutos. La mezcla de reacción se ultraconcentró otra vez por el reemplazo del regulador WS para producir anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos biotinilados. Estos anticuerpos se usaron para el ensayo que se describe a continuación. A la placa FMAT (placa de 384 pocillos Black/Clear Bottom with Lid; Applied Biosystems), se agregaron 5 µ de una solución de PBS suplementada con 2% de FBS (25 µg/ml) del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano obtenido en el EJEMPLO 1, 15 µl de una suspensión de PBS suplementada con 2% de FBS (2 x 10^5 células/ml) de la línea celular CHO que expresa en forma estable nectina-2δ y 5 µl del conjugado de estreptavidina-Alexa Fluor 647 (Invitrogen) y mezclaron entre sí, seguido por su reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de 5 µl de una solución de PBS suplementada con 2% de FBS (0.5 µg/ml) del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano biotinilado preparado de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente se agregaron a cada pocillo, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Para las pruebas de control, se proporcionaron pocillos en los cuales se agregó PBS suplementado con 2% de FBS en lugar de la solución de anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales no marcados. Esta reacción de inhibición competitiva fue realizada con todas las combinaciones de anticuerpos provistas para la biotinilación. Esta placa se ajustó en el sistema de detección celular Applied Biosystems 8200 (Applied Biosystems) para medir

la intensidad de fluorescencia de cada pocillo. La tasa de inhibición competitiva de la combinación de cada anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula.

Tasa de inhibición competitiva = (1-A/B) x 100

A: Valor total de FL1 del pocillo en la cual se agrega anticuerpo no marcado

B: Valor total de FL1 del pocillo en la cual se agrega anticuerpo no marcado

Las tasas de inhibición obtenidas por esta fórmula para todas las combinaciones de los anticuerpos respectivos se analizaron por un programa de computación de análisis multivariado SpotFire DecisionSite de Lead Discovery (Spotfire). Sobre la base de tres diagramas obtenidos de esta manera, los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos se agruparon por epítopes. Como resultado, los anticuerpos se clasificaron en los que pertenecen a siete grandes grupos I a VII y los anticuerpos no afiliados a ninguno de estos grupos. Los grupos de epítopes de cada anticuerpo monoclonal nectina-2 humano se muestran colectivamente en la TABLA 4.

EJEMPLO 5

Actividad inhibidora de la unión trans de nectina-2-nectina-3 de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

Se sabe que la nectina-2 interactúa en trans en forma heterofílica con la nectina-3. La actividad inhibidora de la unión trans de nectina-2-nectina-3 de los respectivos anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos obtenidos en el EJEMPLO 1 se midió en forma cuantitativa por el ensayo Biacore (Biacore 2000; Biacore, cuyo nombre cambió por GE Healthcare) que se describe a continuación. Se dispuso el chip del sensor CM5 (Biacore, cuyo nombre cambió por GE Healthcare) en el Biacore 2000 y se prepararon chips de proteína inmovilizada de Nectina-3ED-Fc por el

siguiente procedimiento. Es decir, clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), adjuntos en el kit de acoplamiento de amina (Biacore, cuyo nombre cambió por GE Healthcare), se disolvieron en agua destilada, y las soluciones resultantes se mezclaron con 100 µl en volúmenes iguales. Mediante el regulador HBS-EP (Biacore, cuyo nombre cambió por GE Healthcare) como regulador de pruebas, la solución de la mezcla se pasó a través del chip sensor con un caudal de flujo de 10 µl/min. durante 7 minutos. A partir de entonces, la Nectina-3ED-mFc (1 mg/ml de solución de PBS) preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 22 se diluyó a 160 µg/ml en regulador de acetato 10 mM (pH 5.0) (Biacore, cuyo nombre cambió por GE Healthcare) y la dilución se pasó a través del chip sensor con un caudal de flujo de 10 µl/min. durante 7 minutos para inmovilizar la proteína en el chip. Posteriormente, la solución de etanolamina ajunta en el mismo kit se pasó a través del chip del sensor chip con un caudal de flujo de 10 µl/min. durante 7 minutos para bloquear los grupos NHS activos restantes. Además, NaOH 10 mM se pasó para lavar el chip sensor con un caudal de flujo de 10 µl/min. durante 1 minuto. Una mezcla de volúmenes iguales de la solución de la proteína de la nectina-2ED-hFc (80 µg/ml del regulador HBS-EP) y una solución del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano o solución del anticuerpo humano control (Human IgG Whole Molecule Chrom Pure; Jackson, Inmuno Research Laboratories) (60 µg/ml HBS-EP regulador) se pasó a través del chip sensor de proteína inmovilizada de Nectina-3ED-Fc preparada de este modo con un caudal de flujo de 20 µl/min. durante 2 minutos. Los cambios de respuesta se registraron y se calculó la tasa de inhibición de la unión trans de nectina 2-nectina-3 de acuerdo con la fórmula que se describe a continuación.

S32

Tasa de inhibición de la unión trans de nectina 2-nectina-3 (%) = (A-B) x 100/A

A: Respuesta cuando se usa anticuerpo control

B: Respuesta cuando se usa el anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano

Las actividades de inhibición de la unión trans de nectina 2-nectina-3 de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos respectivos se muestran colectivamente en al TABLA 5.

EJEMPLO 6

Actividad inhibidora del crecimiento de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos contra la línea celular cancerosa de ovarios humana OV-90

La actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* de la línea celular cancerosa de ovarios humana OV-90 de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos respectivos obtenidos en el EJEMPLO 1 se examinó por el método que se describe a continuación. Para el cultivo de la línea celular OV-90, se usó una mezcla en volúmenes iguales del medio MCDB105 (Sigma) suplementado con 15% FBS y el medio 199 (Sigma). Las células se sembraron en una placa de Petri de cultivo de tejido de 10 cm (Becton Dickinson) con una densidad celular de 4.5 x 10^5/placa cada dos días y se incubaron para un subcultivo a 37°C con un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. La línea celular OV-90 se retiró de la placa de Petri por el tratamiento con 400 U de colagenasa N-2 (Nitta Gelatin) a 37°C durante 2 minutos, seguido por el tratamiento adicional con 2 ml de regulador de disociación celular (Invitrogen) a 37°C durante 15 minutos. La suspensión de células obtenida de este modo se centrifugó (1,000 rpm, 3 minutos) y las células recuperadas se resuspendieron en una mezcla en volúmenes iguales del medio MCDB10^5 y medio 199 suplementado con 1% de FBS con una densidad de 3 x 10^4 células /ml.

S33

Las soluciones de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos obtenidos en el EJEMPLO 1, el anticuerpo policlonal anti-nectina-2 (N2-No. 1) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 14 y anticuerpo humano de control (Human IgG Whole molecule Chrom Pure; Jackson) en PBS, se prepararon para obtener 300 μg/ml o se agregó PBS a una placa de cultivo de 96 pocillos (Becton Dickinson) a razón de 10 μl por pocillo y se agregó la suspensión de células OV-90 descrita anteriormente a razón de 100 μl por pocillo. Adicionalmente, para la medida del nivel umbral para calcular la tasa de inhibición de crecimiento celular descrita a continuación, se prepararon los pocillos que contienen 100 μl del mismo medio y 10 μ de PBS. Después de incubar la placa a 37°C durante 6 días con un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, se agregó una solución WST-8 (Cell Counting Kit-8; Dojindo) como reactivo del ensayo de crecimiento celular a razón de 10 μl por pocillo. Después que la placa se incubó a 37°C durante una hora en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%, se midió la absorbancia (450 nm) de cada pocillo resultante del formazano producido con una placa lectora (Multiskan BICHROMATIC) y la tasa de inhibición de crecimiento de la línea celular OV-90 se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula

Tasa de inhibición de crecimiento celular - [(A-B)-(C-B)] x 100/(A-B)

A: Absorbancia del pocillo al cual se agrega anticuerpo humano de control

B: Absorbancia del pocillo al cual se agrega PBS (no se agrega línea celular OV90)

C: Absorbancia del pocillo al cual se agrega anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano o anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2

En los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

S34

obtenidos, algunos anticuerpos exhibieron actividad inhibidora fuerte o actividad inhibidora débil frente a la línea celular OV-90. Además, el anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 (N2-No. 1) exhibió aproximadamente el 10% de actividad de inhibición de crecimiento frente a la línea celular OV-90 en la concentración final de 30 μg/ml. Las tasas de inhibición de crecimiento de la línea celular OV-90 de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos respectivos (concentración final de 30 μg/ml) *in vitro* se muestran colectivamente en la TABLA 6.

Los 30 anticuerpos que mostraron una actividad inhibidora relativamente fuerte de la línea celular OV-90 en la identificación primaria descrita anteriormente, se prepararon otra vez por incubación de los respectivos hibridomas seguido por purificaciones con cromatografía en columna de Proteína A y HPLC y filtración en gel. Mediante las muestras de anticuerpos altamente purificadas resultantes, se determinó la actividad inhibidora del crecimiento celular dependiente de la concentración (100, 30, 10, 3, 1, 0.3 y 0.03 μg/ml) frente a la línea celular OV-90 por el procedimiento descrito anteriormente. Como resultado, ocho anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos (Nec1-803-2, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-845-2, Nec1-834-1, Nec1-244-3, Nec1-303-2 y Nec1-903-1) se seleccionaron los que exhiben la actividad inhibidora del crecimiento celular dependiente de la concentración de la línea celular OV-90 con buena reproductividad. Estos anticuerpos exhibieron la misma actividad aun cuando la línea celular de OV-90 se implantó en una placa de cultivo de células de 96 pocillos seguida por la solución del anticuerpo. La actividad inhibidora del crecimiento celular de la línea celular OV-90 de los ocho anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos descritos anteriormente se muestra colectivamente en la TABLA 7.

535

TABLA 3

Nombre	EC50 nM	Nombre	EC50 nM	Nombre	EC50 nM
Nec1-102-1	0.44	Nec1-555-5	1.46	Nec1-1142-1	4.45
Nec1-103-1	0.13	Nec1-568-1	0.62	Nec1-1150-2	0.69
Nec1-105-1	1.78	Nec1-608-1	0.60	Nec1-1163-2	0.98
Nec1-108-2	2.46	Nec1-610-2	0.29	Nec1-1202-5	0.71
Nec1-111-3	0.51	Nec1-614-5	0.95	Nec1-1203-1	0.49
Nec1-119-1	0.17	Nec1-631-10	0.91	Nec1-1204-4	10.77
Nec1-124-2	0.90	Nec1-704-1	9.91	Nec1-1209-8	0.96
Nec1-133-2	0.75	Nec1-718-6	0.66	Nec1-1212-7	0.63
Nec1-141-3	1.36	Nec1-718-2	2.15	Nec1-1214-5	0.82
Nec1-144-1	10.95	Nec1-726-1	2.07	Nec1-1216-1	1.02
Nec1-145-2	0.16	Nec1-730-4	0.54	Nec1-1218-3	7.22
Nec1-202-1	0.37	Nec1-738-2	0.39	Nec1-1232-2	0.43
Nec1-205-1	0.48	Nec1-740-2	0.81	Nec1-1234-1	0.95
Nec1-206-2	0.92	Nec1-749-1	3.62	Nec1-1236-1	1.64
Nec1-208-1	0.51	Nec1-755-5	0.40	Nec1-1239-2	1.33
Nec1-209-2	0.26	Nec1-758-8	11.85	Nec1-1302-2	0.53
Nec1-213-2	9.06	Nec1-759-9	0.33	Nec1-1314-3	85.64
Nec1-215-3	1.19	Nec1-765-1	2.68	Nec2-1409-12	5.06
Nec1-217-2	5.40	Nec1-769-2	0.16	Nec2-1411-1	17.31
Nec1-226-3	0.29	Nec1-773-7	0.36	Nec2-1422-1	47.54
Nec1-231-1	3.92	Nec1-803-2	0.23	Nec2-1613-3	1.69
Nec1-233-1	2.35	Nec1-812-4	1.86	Nec2-1625-4	0.35
Nec1-235-1	2.07	Nec1-815-1	0.46	Nec2-1633-4	0.63
Nec1-244-3	6.49	Nec1-818-4	2.18	Nec3-1829-2	8.01
Nec1-259-1	0.13	Nec1-819-2	0.68	Nec3-1907-1	0.26
Nec1-301-2	1.62	Nec1-821-3	1.74	Nec3-1908-4	1.11
Nec1-302-1	2.49	Nec1-831-4	4.26	Nec3-1927-3	0.96
Nec1-303-2	26.77	Nec1-834-1	5.74	Nec3-1932-1	0.71
Nec1-304-2	0.16	Nec1-835-1	3.38	Nec3-2006-1	1.57
Nec1-308-2	0.36	Nec1-842-2	0.80	Nec3-2025-3	0.41
Nec1-311-2	1.35	Nec1-843-1	0.46	Nec3-2036-6	0.45
Nec1-313-1	0.47	Nec1-845-2	0.53	Nec3-2109-2	1.08
Nec1-316-1	0.80	Nec1-847-2	0.50	Nec3-2123-1	1.60
Nec1-319-2	0.17	Nec1-868-7	0.59	Nec3-2134-1	0.72
Nec1-320-1	1.46	Nec1-869-6	0.59	Nec3-2213-1	1.21
Nec1-322-5	0.17	Nec1-878-1	1.56	Nec5-326-1	0.54
Nec1-328-7	2.33	Nec1-888-11	4.42	Nec5-532-1	4.61
Nec1-332-1	2.07	Nec1-903-1	0.21	Nec5-617-7	1.60
Nec1-333-1	1.78	Nec1-907-1	0.22	Nec5-1906-6	0.41
Nec1-336-2	0.14	Nec1-908-2	1.41	Nec5-2309-1	0.37
Nec1-338-1	0.61	Nec1-909-1	1.25	Nec6-151-4	0.62
Nec1-341-10	7.95	Nec1-914-1	0.19	Nec6-505-2	0.47
Nec1-349-1	0.29	Nec1-917-2	0.18	Nec6-940-7	3.10
Nec1-372-2	0.19	Nec1-918-2	22.84	Nec6-947-4	1.31
Nec1-410-3	0.67	Nec1-919-1	0.37	Nec8-3330-1	0.61
Nec1-411-1	0.66	Nec1-920-1	0.79	Nec8-3350-1	0.33
Nec1-416-1	1.00	Nec1-927-14	0.53	Nec8-3410-1	0.34
Nec1-427-2	0.35	Nec1-928-1	0.23	Nec8-3424-1	1.05
Nec1-428-1	0.58	Nec1-929-2	0.71	Nec8-3517-11	0.25
Nec1-445-4	1.41	Nec1-930-1	4.05	Nec8-3523-2	0.51
Nec1-458-6	3.39	Nec1-938-1	3.73	Nec8-3524-14	0.30
Nec1-460-1	4.42	Nec1-938-2	2.09	Nec8-3669-4	0.50
Nec1-464-1	3.92	Nec1-940-1	2.21	Nec8-3704-7	0.88
Nec1-470-2	1.75	Nec1-948-3	1.31	Nec8-3717-4	0.96
Nec1-501-1	0.33	Nec1-964-1	0.36	Nec8-3723-3	0.25
Nec1-503-8	0.42	Nec1-1004-2	0.69	Nec8-3734-1	0.38
Nec1-505-3	117.40	Nec1-1005-2	2.32	Nec8-3806-2	1.32
Nec1-506-1	0.73	Nec1-1008-1	10.97	Nec8-3814-17	0.19
Nec1-507-1	0.27	Nec1-1012-1	0.12	Nec8-3823-5	0.40
Nec1-508-2	0.56	Nec1-1020-1	0.60	Nec8-3833-6	0.87
Nec1-520-1	0.39	Nec1-1021-1	0.27	Nec8-3941-4	0.45
Nec1-521-3	10.60	Nec1-1036-5	1.59	Nec8-4024-5	0.47
Nec1-522-2	1.00	Nec1-1039-3	0.72	Nec8-4111-2	0.20
Nec1-526-1	0.27	Nec1-1044-4	2.05	Nec8-4116-8	0.36
Nec1-528-2	0.62	Nec1-1085-1	7.70	Nec8-4144-2	0.28
Nec1-530-1	0.79	Nec1-1115-2	0.71	Nec8-4188-1	0.98
Nec1-538-3	1.10	Nec1-1128-1	0.87	Nec8-4244-8	0.48
Nec1-546-5	1.56	Nec1-1132-2	1.58	Nec8-4315-1	0.78
Nec1-549-4	0.38	Nec1-1138-1	4.07	Nec8-4324-5	0.29
Nec1-554-1	1.11	Nec1-1139-1	0.58		

TABLA 3A

Nombre	subtipo Cadena H/cadena L	Nombre	subtipo Cadena H/cadena L	Nombre	subtipo cadena H/ cadena L

536

Nec1-102-1	G1/k	Nec1-555-5	G4/k	Nec1-1138-1	G1/k
Nec1-103-1	G1/k	Nec1-568-1	G1/k	Nec1-1139-1	G4/k
Nec1-105-1	G2/k	Nec1-608-1	G1/k	Nec1-1142-1	G4/k
Nec1-108-2	G1/k	Nec1-610-2	G1/k	Nec1-1150-2	G1/k
Nec1-111-3	G1/k	Nec1-614-5	G1/k	Nec1-1163-2	G1/k
Nec1-119-1	G1/k	Nec1-631-10	G2/k	Nec1-1202-5	G1/k
Nec1-124-2	G1/k	Nec1-704-1	G1/k	Nec1-1203-1	G1/k
Nec1-133-2	G4/k	Nec1-716-6	G1/k	Nec1-1204-4	G1/k
Nec1-141-3	G1/k	Nec1-718-2	G1/k	Nec1-1209-8	G1/k
Nec1-144-1	G1/k	Nec1-726-1	G1/k	Nec1-1212-7	G4/k
Nec1-145-2	G1/k	Nec1-730-4	G1/k	Nec1-1214-5	G1/k
Nec1-202-1	G1/k	Nec1-738-2	G1/k	Nec1-1216-1	G1/k
Nec1-205-1	G1/k	Nec1-740-2	G1/k	Nec1-1218-7	G2/k
Nec1-206-2	G1/k	Nec1-755-5	G1/k	Nec1-1232-2	G1/k
Nec1-208-1	G1/k	Nec1-758-8	G1/k	Nec1-1234-1	G1/k

S37.

Nec1-209-2	G1/k	Nec1-759-9	G2/k	Nec1-1236-1	G1/k
Nec1-213-2	G1/k	Nec1-765-1	G2/k	Nec1-1239-2	G1/k
Nec1-215-3	G1/k	Nec1-769-2	G1/k	Nec1-1302-2	G1/k
Nec1-217-2	G1/k	Nec1-773-7	G4/k	Nec1-1305-1	G1/k
Nec1-231-1	G1/k	Nec1-803-3	G1/k	Nec1-1314-3	G2/k
Nec1-235-1	G4/k	Nec1-812-4	G1/k	Nec2-1409-12	G1/k
Nec1-244-3	G1/k	Nec1-815-1	G1/k	Nec2-1411-1	G1/k
Nec1-259-1	G1/k	Nec1-818-4	G2/k	Nec2-1422-1	G4/k
Nec1-301-2	G1/k	Nec1-819-2	G1/k	Nec2-1613-3	G2/k
Nec1-302-1	G1/k	Nec1-821-3	G1/k	Nec2-1625-4	G4/k
Nec1-303-2	G1/k	Nec1-831-4	G1/k	Nec2-1633-4	G1/k
Nec1-304-2	G1/k	Nec1-834-1	G1/k	Nec3-1829-2	G4/k
Nec1-308-2	G1/k	Nec1-835-1	G1/k	Nec3-1907-1	G4/k
Nec1-313-1	G1/k	Nec1-842-2	G1/k	Nec3-1908-4	G1/k
Nec1-316-1	G1/k	Nec1-843-1	G1/k	Nec3-1927-3	G4/k

538

Nec1-319-2	G1/k	Nec1-845-2	G1/k	Nec3-1932-1	G4/k
Nec1-320-1	G1/k	Nec1-847-2	G1/k	Nec3-2006-1	G1/k
Nec1-322-5	G1/k	Nec1-868-7	G4/k	Nec3-2025-3	G1/k
Nec1-326-7	G1/k	Nec1-869-6	G1/k	Nec3-2036-6	G1/k
Nec1-332-1	G1/k	Nec1-878-1	G1/k	Nec3-2109-2	G2/k
Nec1-333-1	G1/k	Nec1-888-11	G1/k	Nec3-2123-1	G1/k
Nec1-336-2	G4/k	Nec1-903-1	G1/k	Nec3-2134-1	G4/k
Nec1-338-1	G2/k	Nec1-907-1	G1/k	Nec3-2213-1	G1/k
Nec1-341-10	G1/k	Nec1-908-2	G1/k	Nec5-323-2	G4/k
Nec1-349-1	G1/k	Nec1-909-1	G1/k	Nec5-326-1	G2/k
Nec1-411-1	G4/k	Nec1-914-1	G1/k	Nec5-532-1	G1/k
Nec1-416-1	G2/k	Nec1-917-2	G1/k	Nec5-617-7	G4/k
Nec1-427-2	G4/k	Nec1-918-2	G1/k	Nec5-2309-7	G2/k
Nec1-428-1	G1/k	Nec1-919-1	G1/k	Nec6-505-2	G4/k
Nec1-445-4	G1/k	Nec1-920-1	G1/k	Nec6-940-7	G4/k

Nec1-458-6	G1/k	Nec1-927-14	G4/k	Nec8-3350-1	G4/k
Nec1-460-1	G4/k	Nec1-930-1	G1/k	Nec8-3410-1	G1/k
Nec1-464-1	G1/k	Nec1-938-2	G1/k	Nec8-3517-11	G1/k
Nec1-470-2	G1/k	Nec1-940-2	G1/k	Nec8-3523-3	G1/k
Nec1-501-1	G4/k	Nec1-948-3	G1/k	Nec8-3524-14	G1/k
Nec1-503-8	G4/k	Nec1-964-1	G1/k	Nec8-3669-4	G1/k
Nec1-505-3	G2/k	Nec1-1004-2	G1/k	Nec8-3704-7	G1/k
Nec1-506-1	G1/k	Nec1-1005-2	G4/k	Nec8-3717-4	G4/k
Nec1-507-1	G1/k	Nec1-1008-1	G4/k	Nec8-3723-3	G1/k
Nec1-508-2	G4/k	Nec1-1012-1	G2/k	Nec8-3734-1	G2/k
Nec1-520-1	G1/k	Nec1-1020-1	G4/k	Nec8-3806-2	G2/k
Nec1-522-2	G2/k	Nec1-1021-2	G1/k	Nec8-3814-17	G1/k
Nec1-526-1	G4/k	Nec1-1036-5	G1/k	Nec8-3823-5	G1/k
Nec1-528-2	G1/k	Nec1-1039-3	G1/k	Nec8-3833-6	G4/k
Nec1-530-2	G1/k	Nec1-1044-4	G1/k	Nec8-4024-5	G1/k

S40

Nec1-538-3	G2/k	Nec1-1085-1	G1/k	Nec8-4116-8	G1/k
Nec1-546-5	G1/k	Nec1-1115-2	G1/k	Nec8-4144-2	G4/k
Nec1-549-4	G4/k	Nec1-1132-2	G1/k	Nec8-4188-1	G4/k
Nec1-554-1	G1/k				

S41

TABLA 4

Nombre	epitope	Nombre	epitope	Nombre	epitope
Nec1-102-1	VI	Nec1-555-5	IV	Nec1-1142-1	IV
Nec1-103-1	VII	Nec1-568-1	VII	Nec1-1150-2	VI
Nec1-105-1	VI	Nec1-608-1	VII	Nec1-1163-2	VI
Nec1-108-2	VII	Nec1-610-2	V	Nec1-1202-5	V
Nec1-111-3	VI	Nec1-614-5	VII	Nec1-1203-1	I
Nec1-119-1	VII	Nec1-631-10	V	Nec1-1204-4	I
Nec1-124-2	VII	Nec1-704-1	VI	Nec1-1209-8	I
Nec1-133-2	V	Nec1-716-6	V	Nec1-1212-7	VII
Nec1-141-3	VI	Nec1-718-2	V	Nec1-1214-5	VI
Nec1-144-1	VI	Nec1-726-1	IV	Nec1-1216-1	V
Nec1-145-2	VII	Nec1-730-4	VI	Nec1-1218-7	IV
Nec1-202-1	I	Nec1-738-2	VI	Nec1-1232-2	VII
Nec1-205-1	V	Nec1-740-2	V	Nec1-1234-1	I
Nec1-206-2	VII	Nec1-749-1	ND	Nec1-1236-1	IV
Nec1-208-1	V	Nec1-755-5	VI	Nec1-1239-2	IV
Nec1-209-2	VI	Nec1-758-8	II	Nec1-1302-2	IV
Nec1-213-2	III	Nec1-759-9	VI	Nec1-1305-1	V
Nec1-215-3	IV	Nec1-765-1	VI	Nec1-1314-3	VI
Nec1-217-2	III	Nec1-769-2	V	Nec2-1409-12	IV
Nec1-226-3	V	Nec1-773-7	VII	Nec2-1411-1	ND
Nec1-231-1	IV	Nec1-803-2	VI	Nec2-1422-1	ND
Nec1-233-1	ND	Nec1-812-4	IV	Nec2-1613-3	IV
Nec1-235-1	V	Nec1-815-1	VII	Nec2-1625-4	VI
Nec1-244-3	VI	Nec1-818-4	VI	Nec2-1633-4	VII
Nec1-259-1	VI	Nec1-819-2	VII	Nec3-1829-2	VI
Nec1-301-2	V	Nec1-821-3	I	Nec3-1907-1	V
Nec1-302-1	I	Nec1-831-4	IV	Nec3-1908-4	VI
Nec1-303-2	IV	Nec1-834-1	VI	Nec3-1927-3	V
Nec1-304-2	VII	Nec1-835-1	IV	Nec3-1932-1	V
Nec1-308-2	VII	Nec1-842-2	I	Nec3-2006-1	VII
Nec1-311-2	ND	Nec1-843-1	VI	Nec3-2025-3	V
Nec1-313-1	VI	Nec1-845-2	VI	Nec3-2036-6	VII
Nec1-316-1	VI	Nec1-847-2	VI	Nec3-2109-2	V
Nec1-319-2	VI	Nec1-868-7	VII	Nec3-2123-1	V
Nec1-320-1	I	Nec1-869-6	VI	Nec3-2134-1	VII
Nec1-322-5	V	Nec1-878-1	V	Nec3-2213-1	V
Nec1-326-7	IV	Nec1-888-11	III	Nec5-326-1	V
Nec1-332-1	VI	Nec1-903-1	VI	Nec5-532-1	IV
Nec1-333-1	IV	Nec1-907-1	VII	Nec5-617-7	VII
Nec1-336-2	VII	Nec1-908-2	VII	Nec5-1906-6	I
Nec1-338-1	VII	Nec1-909-1	VI	Nec5-2309-7	I
Nec1-341-10	IV	Nec1-914-1	VII	Nec6-151-4	ND
Nec1-349-1	VII	Nec1-917-2	VII	Nec6-505-2	VI
Nec1-372-2	V	Nec1-918-2	VI	Nec6-940-7	IV
Nec1-410-3	ND	Nec1-919-1	V	Nec6-947-4	ND
Nec1-411-1	VII	Nec1-920-1	V	Nec8-3734-1	I
Nec1-416-1	I	Nec1-927-14	VII	Nec8-3330-1	V
Nec1-427-2	VII	Nec1-928-1	V	Nec8-3350-1	VII
Nec1-428-1	V	Nec1-929-2	V	Nec8-3410-1	VII
Nec1-445-4	IV	Nec1-930-1	III	Nec8-3424-1	V
Nec1-458-6	IV	Nec1-938-1	ND	Nec8-3517-11	VII
Nec1-460-1	II	Nec1-938-2	III	Nec8-3523-3	V
Nec1-464-1	II	Nec1-940-2	IV	Nec8-3524-14	VII
Nec1-470-2	IV	Nec1-948-3	VI	Nec8-3669-4	VII
Nec1-501-1	VII	Nec1-964-1	I	Nec8-3704-7	VII
Nec1-503-8	VII	Nec1-1004-2	V	Nec8-3717-4	V
Nec1-505-3	VI	Nec1-1005-2	IV	Nec8-3723-3	VII
Nec1-506-1	V	Nec1-1008-1	IV	Nec8-3806-2	VII
Nec1-507-1	V	Nec1-1012-1	V	Nec8-3814-17	VII
Nec1-508-2	VI	Nec1-1020-1	VII	Nec8-3823-5	V
Nec1-520-1	VI	Nec1-1021-2	V	Nec8-3833-6	VII
Nec1-521-3	ND	Nec1-1036-5	I	Nec8-3941-4	VI
Nec1-522-2	VI	Nec1-1039-3	I	Nec8-4024-5	VI
Nec1-526-1	VII	Nec1-1044-4	IV	Nec8-4111-2	V
Nec1-528-2	V	Nec1-1085-1	II	Nec8-4116-8	VII
Nec1-530-1	VI	Nec1-1115-2	I	Nec8-4144-2	VII
Nec1-538-3	VI	Nec1-1128-1	ND	Nec8-4188-1	VII
Nec1-546-5	V	Nec1-1132-2	V	Nec8-4244-8	V
Nec1-548-4	VII	Nec1-1138-1	IV	Nec8-4315-1	V
Nec1-554-1	IV	Nec1-1139-1	VII	Nec8-4324-5	V

TABLA 5

Nombre	Inhibición de unión trans (%)
Nec1-102-1	31
Nec1-111-3	44
Nec1-209-2	88
Nec1-244-3	35
Nec1-303-2	6
Nec1-313-1	12
Nec1-316-1	56
Nec1-319-2	70
Nec1-332-1	93
Nec1-505-3	8
Nec1-506-1	83
Nec1-508-2	92
Nec1-530-1	36
Nec1-704-1	23
Nec1-730-4	43
Nec1-738-2	79
Nec1-755-5	84
Nec1-765-1	5

Nombre	Inhibición de unión trans (%)
Nec1-803-2	91
Nec1-818-4	97
Nec1-834-1	86
Nec1-843-1	89
Nec1-845-2	86
Nec1-869-6	80
Nec1-903-1	85
Nec1-918-2	73
Nec1-1115-2	13
Nec1-1128-1	23
Nec1-1150-2	82
Nec1-1209-8	8
Nec1-1214-5	6
Nec3-2025-3	91
Nec5-323-2	60
Nec6-505-2	86
Nec8-4024-5	93

S43

TABLA 6

Nombre	Media de inhibición de crecimiento (%) (vs OV-90)
Nec1-102-1	6.7
Nec1-141-3	11.2
Nec1-144-1	9.9
Nec1-209-2	9.7
Nec1-244-3	16.7
Nec1-259-1	12.4
Nec1-303-2	18.4
Nec1-311-2	12.3
Nec1-313-1	7.1
Nec1-316-1	13.5
Nec1-319-2	12.9
Nec1-332-1	8.4
Nec1-505-3	9.8
Nec1-508-2	6.2
Nec1-520-1	10.0
Nec1-530-1	16.9
Nec1-555-5	11.3
Nec1-631-10	15.0
Nec1-730-4	9.2
Nec1-738-2	21.2
Nec1-749-1	16.5
Nec1-755-5	12.7
Nec1-758-8	6.3
Nec1-765-1	7.6
Nec1-803-2	13.3
Nec1-818-4	5.3

Nombre	Media de inhibición de crecimiento (%) (vs OV-90)
Nec1-834-1	14.5
Nec1-843-1	9.5
Nec1-845-2	12.3
Nec1-878-1	17.7
Nec1-888-11	8.3
Nec1-903-1	16.9
Nec1-908-2	14.7
Nec1-909-1	16.9
Nec1-918-2	15.0
Nec1-938-2	9.4
Nec1-1085-1	6.5
Nec1-111-3	11.2
Nec1-1150-2	13.0
Nec1-1163-2	5.7
Nec1-1204-4	11.6
Nec1-1209-8	13.2
Nec1-1214-5	7.3
Nec1-1314-3	12.8
Nec2-1625-4	7.2
Nec5-323-2	10.2
Nec6-505-2	6.6
Nec8-3704-7	16.9
Nec8-3941-4	10.5
Nec8-4024-5	13.4
Nec8-4116-8	14.1

S44

TABLA 7

Nombre	Conc. de anticuerpo (µg/ml)	Inhibición de crecimiento (%)
Nec1-244-3	100ug/ml	9.2
	30ug/ml	7.0
	10ug/ml	6.9
	3ug/ml	7.0
	1ug/ml	4.9
	0.3ug/ml	2.0
	0.03ug/ml	-1.3
Nec1-303-2	100ug/mL	6.2
	30ug/ml	6.9
	10ug/mL	5.5
	3ug/ml	3.0
	1ug/mL	5.1
	0.3ug/ml	-2.9
	0.03ug/ml	-7.4
Nec1-520-1	100ug/ml	8.5
	30ug/ml	11.3
	10ug/ml	13.7
	3ug/ml	9.3
	1ug/ml	7.0
	0.3ug/ml	1.2
	0.03ug/ml	2.0
Nec1-530-1	100ug/ml	13.7
	30ug/ml	9.6
	10ug/ml	8.2
	3ug/ml	10.3
	1ug/ml	8.2
	0.3ug/ml	0.5
	0.03ug/ml	-4.6

Nombre	Conc. de anticuerpo (µg/ml)	Inhibición de crecimiento (%)
Nec1-803-2	100ug/ml	17.4
	30ug/ml	14.3
	10ug/ml	16.8
	3ug/ml	13.5
	1ug/ml	15.5
	0.3ug/ml	15.1
	0.03ug/ml	3.8
Nec1-834-1	100ug/ml	11.8
	30ug/ml	12.9
	10ug/ml	8.3
	3ug/ml	9.6
	1ug/ml	12.8
	0.3ug/ml	0.8
	0.03ug/ml	2.9
Nec1-845-1	100ug/ml	15.7
	30ug/ml	8.3
	10ug/mL	10.3
	3ug/ml	5.8
	1ug/ml	11.8
	0.3ug/ml	4.6
	0.03ug/ml	-3.2
Nec1-903-1	100ug/ml	5.8
	30ug/ml	7.3
	10ug/ml	2.8
	3ug/ml	3.9
	1ug/ml	4.5
	0.3ug/ml	-1.3
	0.03ug/ml	-6.3

S45

EJEMPLO 7

ADCC (citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo) de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

En los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1, los Nec1-803-2, Nec8-4116-8, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-845-2, Nec8-3941-4, Nec1-834-1, Nec1-244-3, Nec1-918-2, Nec8-3806-1, Nec1-303-2 y Nec1-903-1 se aplicaron a una medición de ADCC. La línea de célula cancerosa ovárica humana OV-90 se usó como células blanco y las células mononucleares de sangre periférica humana congelada disponible en el mercado (Asahi Techno Glass Corp.) que habían sido cultivadas durante toda la noche en el medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con IL-2 10 nM recombinante humana (DIACLONE Research Inc.), 55 μM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen) y 10% de FBS (JRH) se usaron como células efectoras, respectivamente.

La línea celular OV-90 en la fase de crecimiento logarítmico se recuperó por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 6. Un millón de células se marcaron con ^{51}Cr, por adición de 250 μCi de $Na_2{}^{51}CrO_4$ (Amersham Biosciences, cuyo nombre cambió por GE Healthcare Bio-sciences) seguido por la incubación a 37°C durante una hora. Estas células se lavaron 4 veces con el medio RPMN 1640 que contiene 0.4% de BSA (Invitrogen) (de aquí en adelante denominado medio BSA al 0.4% /RPMI) y luego se resuspendieron a 1 x 10^5 células/ml en el medio BSA al 0.4% /RPMI. Luego 100 μL (1 x 10^4 células) de esta suspensión de células blanco y 50 μl de solución en la cual se diluyeron los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos descritos en el medio BSA al 0.4% /RPMI en concentraciones finales de 0.015 μg/ml, 0.15 μg/ml y 1.5 μg/ml , y 50 μl se agregaron a cada pocillo de una placa RMC de 96 pocillos (BIOBIK). El mismo volumen de IgG human no inmune

(concentración final de 1.5 μg/ml) o D-PBS (Invitrogen) se agregó como control negativo. Después de incubar estas placas en hielo durante una hora, se agregaron 5 x 10^5 células por cada pocillo de la suspensión de célula efectora descrita anteriormente (células efectoras:células blanco = 50:1), las cuales se hicieron reaccionar a 37°C durante 4 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. La suspensión celular de cada pocillo se transfirió a una pantalla múltiple de 96 pocillos de 45 μm (Millipore) y se centrifugaron para recuperar los sobrenadantes del cultivo. La radioactividad (liberación de la muestra) filtrada de las células en estos sobrenadantes del cultivo se determina mediante un contador γ (AccuFLEX γ7000; Aloka Co.). La actividad citotóxica máxima (liberación máxima) de ADCC se definió como la actividad detectada en el sobrenadante cuando se agregó Triton-X 100 (Sigma) a una concentración final de 1%, mientras que la actividad de liberación espontánea (liberación espontánea) ADCC se definió como la actividad detectada en el sobrenadante cuando se agregó medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS en lugar de las células efectoras respectivamente. La lisis específica (%) como un indicador de la intensidad de ADCC se calculó por ([liberación de muestra]-[liberación espontánea])/(liberación máxima]-[liberación espontánea]) x 100 (TABLA 8). La ADCC (lisis específica (%)) fue de 17% cuando se agregó IgG humana no inmune IgG (concentración final de 1.5 μg/ml) y cuando se agregó D-PBS mientras que la ADCC de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos Nec1-803-2, Nec8-4116-8, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-845-2, Nec8-3941-4, Nec1-834-1 y Nec1-903-1, que pertenecen a la subclase IgG_1, mostró porcentajes tan significativamente altos como 35%, 34%, 30%, 27%, 30%, 34%, 31% y 32%, respectivamente, en 1.5 μg/ml. En particular, el anticuerpo Nec8-4116-8 exhibió ADCC más potente que los otros

SA 7

anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos, representada por la lisis específica de 33% en la concentración final de anticuerpo de 0.015 μg/ml.

S48

TABLA 8

Anticuerpo	Conc de antic (ug/ml)	Lisis específica (%)
IgG no inmune	1.5	17
No Ab	–	17
Nec1-803-2	0.015	23
	0.15	31
	1.5	35
Nec8-4116-8	0.015	33
	0.15	33
	1.5	34
Nec1-520-1	0.015	21
	0.15	27
	1.5	30
Nec1-530-1	0.015	19
	0.15	25
	1.5	27
Nec1-845-2	0.015	22
	0.15	28
	1.5	30
Nec8-3941-4	0.015	23
	0.15	32
	1.5	34
Nec1-834-1	0.015	19
	0.15	26
	1.5	31
Nec1-244-3	0.015	16
	0.15	22
	1.5	24
Nec1-918-2	0.015	21
	0.15	22
	1.5	25
Nec8-3806-1	0.015	16
	0.15	20
	1.5	22
Nec1-303-2	0.015	21
	0.15	26
	1.5	24
Nec1-903-1	0.015	24
	0.15	33
	1.5	32
Liberación espontánea	–	0
Liberación máxima	–	100

EJEMPLO 8

Preparación adicional de anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

Además de los anticuerpos preparados en el EJEMPLO 1, los ratones KM se inmunizaron por el siguiente procedimiento para preparar adicionalmente anticuerpos monoclonales anti-nectina-2

S49

humanos. En otras palabras, una emulsión preparada por la mezcla de la proteína de la nectina-2ED-Fc (1.6 mg/ml de la solución de PBS) preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 16 con un volumen equivalente del adyuvante de Freund completo (Difco)se administró por vía subcutánea e intracutánea a cinco ratones KM (10 semanas, 12 semanas, macho; Kirin Brewery Co., Ltd.), a una dosis de 50 μg/ratón. Dos semanas después, la emulsión proteica preparada mediante el adyuvante de Freund incompleto (Difco) se administró por vía subcutánea o intracutánea al ratón, con una dosis de 25 μg/ratón seguido por la inmunización adicional de la misma emulsión de proteína con una dosis de 10 μg/ratón después del intervalo de dos semanas.

Antes de la primera inmunización y una semana después de la tercera inmunización, se recogió sangre del fondo ocular de todos los ratones bajo anestesia con éter para preparar los antisueros y se determinó la titulación de anticuerpos del suero en una manera similar al procedimiento descrito en el EJEMPLO 1. Se administró nectina-2ED-Fc en una dosis de 10 μg a cada ratón por inyección en la vena de la cola al ratón KM en el cual se confirmó un aumento suficiente de la titulación del anticuerpo del suero como refuerzo adicional. Los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano se obtuvieron adicionalmente del ratón y el anticuerpo se preparó a partir del sobrenadante del cultivo del mismo por un procedimiento igual al descrito en el EJEMPLO 1.

EJEMPLO 9

Reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos con las proteínas de la nectina-1, nectina-3, nectina-4 y Nec1-5

Con el fin de confirmar la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano preparado en el EJEMPLO 1

para la nectina-2 humana, se examinó la reactividad cruzada con las proteínas de la familia de la nectina humana (Nectina-1, Nectina-3 y Nectina-4) y Nec1-5 humana por citometría de flujo (de aquí en adelante denominada FCM) mediante células que expresan en forma transitoria estas proteínas. Específicamente, se incubó una línea de células CHO-K1 en un matraz T75 cargado con una mezcla de medios de DMEM y F-12 en volúmenes equivalentes (Invitrogen) suplementado con 10 % de FBS (JRH) a 37°C durante 1 a 2 días en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. Cuando las células son aproximadamente 90% confluentes, el pEE12,4-nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 18, pCMV-Tag4-Nectina-1, pCMV-Tag4-Nectina-3, pCMV-Tag4-Nectina-4 y pCMV-Tag4-Nec1-5 preparados en el EJEMPLO DE REFERENCIA 29 y el pADNc3,1(+) (Invitrogen) como control negativo se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo adjunto. Cuatro horas después de la transfección, el medio para las células CHO-K1 transfectadas con estos genes se intercambió con una alícuota fresca del medio descrito anteriormente, seguido por la incubación durante 2 días adicionales. Estas células se lavaron dos veces con D-PBS, se retiraron con regulador de disociación de células, libre de enzimas, basado en PBS (Invitrogen) y se resuspendieron en D-PBS (-) que contiene 1% de FBS y 0.1% de azida sódica (de aquí en adelante denominado regulador FCM) con una densidad de 5 x 10^6células/ml. Estas suspensiones celulares se agregaron a una placa de extremo inferior en V de 96 pocillos a razón de 30 µl a cada una y 20 µl anticuerpo monoclonal humano nectina-2 anti humana (Nec1-803-2, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-834-1, Nec1-244-3, Nec1-303-2, Nec1-903-1 o Nec8-4116-8) y anticuerpos de control positivo [anticuerpo monoclonal de ratón nectina-1 anti humana (ZYMED), anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2

N2-No. 2 preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 14, anticuerpo de conejo policlonal nectina-3 anti-humana preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 27, anticuerpo de cabra policlonal nectina-4 anti-humana (R & D) o , anticuerpo monoclonal de ratón Nec1-5 anti-humano (LAB VISION)] diluido en regulador FCM a 15 μg/ml (concentración final 6 μg/ml) se agregaron al mismo, seguido por su reacción en hielo durante una hora. Después se agregaron 200 μl de regulador FCM a cada pocillo y se lavaron una vez por una operación de centrifugación, se agregaron 50 μ/pocillo anticuerpo secundario marcado con Alexa488 diluido en regulador FCM a 10 μg/ml para la suspensión, la cual luego se hizo reaccionar en hielo durante una hora. El anticuerpo secundario usado fue IgG anti-humana de cabra Alexa Fluor488 (H+L) cuando se usó anticuerpo humano como anticuerpo primario, IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor488 (H+L) cuando se usó anticuerpo de ratón como anticuerpo primario, IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor488 (H+L) cuando se usó anticuerpo de conejo como anticuerpo primario e IgG anti-cabra de burro Alexa Fluor488 (H+L) (Invitrogen) cuando se usó anticuerpo de burro como anticuerpo primario, respectivamente. Luego estas células se lavaron adicionalmente dos veces con regulador FCM y luego se resuspendieron en 250 μl de regulador FCM, la intensidad de fluorescencia de las células teñidas se midió por el citómetro de flujo MPL500 (BECKMAN COULTER). Se calculó para cada anticuerpo la proporción del valor medio de las intensidades de fluorescencia del plásmido de control negativo pADNc3,1(+)-transfectado a las células CHO-K1 al valor medio de las intensidades de fluorescencia de cada una de las células CHO-K1 transfectadas con el gen. Los resultados se muestran en la TABLA 9. Cuando esta proporción es 1, se considera que el anticuerpo no se une a toda la proteína, mientras que a mayor proporción, mas

552

fuerte es la unión del anticuerpo a la proteína. Estos resultados revelan que los ocho anticuerpos monoclonales humanos de nectina-2 anti-humanos provistos para este experimento son anticuerpo específicos de nectina-2 humanos que no presentan reacción cruzada con los otras proteínas de la familia de nectina humana (nectina-1, nectina-3 y nectina-4) o Nec1-5.

TABLA 9

	Necti-na-1	Necti-na-2	Necti-na-3	Necti-na-4	Nec1- 5
Anticuerpo de control positivo	79.9	151.6	10.7	3.7	496.8
Nec1-803-2	1.2	75.0	1.2	1.1	1.1
Nec1-520-1	1.1	62.6	1.1	1.2	1.0
Nec1-530-1	1.0	66.7	1.2	1.1	1.0
Nec1-834-1	1.2	63.1	1.2	1.1	1.0
Nec1-244-3	1.2	57.5	1.2	1.2	1.1
Nec1-303-2	1.0	11.1	1.0	0.9	0.9
Nec1-903-1	1.2	71.9	1.2	1.1	1.2
Nec8-4116-8	1.3	71.7	1.1	1.1	1.0

EJEMPLO 10

Actividad inhibidora de la unión trans de la nectina-2-nectina-2 de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

Las actividades inhibidoras de la unión trans de la nectina-2-nectina-2 de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

obtenidos en los EJEMPLOS 1 y 8 se evaluaron cuantitativamente por el siguiente método que utiliza espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo. Primero, 1 mg de la proteína de la nectina-2ED-Fc preparada en el EJEMPLO DE REFENCIA 16 se concentró y reemplazó con regulador de carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6) por medio de ultrafiltración para preparar 4 mg/ml de la solución. Después de agregar el reactivo de marcación con Eu adjunto en el kit de marcación con Eu DELFIA (Perkin Elmer) a esta solución de nectina-2ED-Fc, la mezcla se hizo reaccionar a 4°C durante toda la noche. El Eu^{3+} no reaccionado se eliminó de la mezcla de reacción por la ultrafiltración mencionada anteriormente y al mismo tiempo, el regulador se reemplazó con PBS para preparar nectina-2ED-Fc marcada con Eu. El número de Eu^{3+} introducido en este caso fue 5.23 moléculas por molécula de nectina-2-ED-Fc. Después, la nectina-2-ED-Fc se diluyó en regulador de carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6) a una concentración de 5 μg/ml y la dilución se agregó a la placa Wallac Delfia (Perkin Elmer) a razón de 100 μl por pocillo, el cual se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas. Desde este momento, se agregaron 200 μl de PBS que contiene 2% de BSA, PBS a cada pocillo para bloquear durante toda la noche a 4°C. Después de lavar la placa dos veces con PBS que contiene 0.05% de Tween 20 (PBS-T), anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano o hIgG de control (Human IgG Whole molecule Chrom Pure; Jackson Immuno Research Laboratories) diluida en PBS que contiene 0.2% de BSA a 600 μg/ml se mezcló con un volumen equivalente de nectina-2ED-Fc marcada con Eu diluida en PBS que contiene 0.2% de BSA a 6.4 μg/ml, la cual se agregó a razón de 100 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Después esta placa se lavó 6 veces con PBS-T, se agregaron 200 μl a cada pocillo de solución mejoradora (Perkin Elmer) seguida por agitación a

SS4

temperatura ambiente durante un minuto con un mezclador de placa. La fluorescencia de cada pocillo que reaccionó de este modo se midió a 615 nm (luz de excitación: 340 nm, tiempo de retardo: 400 μsegs.) empleando el contador ARVO 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer), y la tasa de inhibición de la unión trans de nectina-2-nectina-2 se calculó por la siguiente fórmula.

Tasa de inhibición de la unión trans de nectina-2-nectina-2 (%) = (A - B) x 100/A

A: Conteos cuando se usa hIgG de control

B: Conteos cuando se usa anticuerpo monoclonal humano anti-nectina-2

Las actividades inhibidoras de la unión trans de nectina-2-nectina-2 de los respectivos anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos se muestran colectivamente en la TABLA 10.

555

TABLA 10

Nombre	Nectina-2-nectina-2 Inhibición de la unión trans (%)
Nec1-244-3	28
Nec1-259-1	24
Nec1-303-2	19
Nec1-316-1	30
Nec1-631-10	78
Nec1-738-3	38
Nec1-740-1	71
Nec1-834-1	40
Nec1-878-1	69
Nec1-918-2	34
Nec1-1115-2	7
Nec1-1150-2	48
Nec1-1209-8	28
Nec8-3717-4	70
Nec8-3823-4	79
Nec8-4024-5	30
Nec8-4111-2	76

556

Nombre	Nectina-2-nectina-2 Inhibición de la unión trans (%)
Control hIgG	0

EJEMPLO 11

ADCC (citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo) de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

El los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1, Nec1-964-1 del Grupo I, Nec1-303-1, Nec1-554-1 y Nec1-1302-2 del Grupo V, Nec1-769-2 y Nec1-1305-1 del Grupo V, Nec1-141-3, Nec1-209-2, Nec1-909-1, Nec1-847-2 y Nec1-803-2 del Grupo VI, Nec8-4116-8 del Grupo VII se usaron para una medición de ADCC. La línea de célula cancerosa ovárica humana OV-90 se usó como células blanco y las células mononucleares de sangre periférica humana congelada disponible en el mercado(Asahi Techno Glass Corp.) que habían sido cultivadas durante toda la noche en el medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 0.1 nM de IL-2 recombinante humana (DIACLONE Research Inc.), 55 μM 2-mercaptoetanol (Invitrogen) y 10% de FBS (JRH).

La línea celular OV-90 en la fase de crecimiento logarítmico se recuperó por el procedimiento descrito en el EJEMPLO 6. Un millón de células se marcaron con ^{51}Cr ,por adición de 250 μCi de $Na_2{}^{51}CrO_4$ (GE Healthcare) seguido por la incubación a 37°C durante una hora. Estas células se lavaron 4 veces con el medio RPMN 1640 que contiene 0.4% de BSA (Invitrogen) (de aquí en adelante denominado medio BSA 0.4% /RPMI) y luego se resuspendieron a 1 x 10^5células/ml en el medio BSA 0.4% /RPMI. Luego 100 μL (1 x 10^4 células) de esta suspensión de células

SSf

blanco y 50 µl de solución en la cual se diluyeron los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos descritos en el medio BSA ,4% /RPMI en concentraciones finales de 0.015 µg/ml, 0.15 µg/ml y 1.5 µg/ml , y 50 µl se agregaron a cada pocillo de una placa RMC de 96 pocillos (BIOBIK). El mismo volumen de IgG humana no inmune (concentración final de 1.5 µg/ml) o D-PBS (Invitrogen) se agregó como control negativo. Después de incubar estas palcas en hielo durante una hora, se agregaron 5 x 10^5 células por cada pocillo de la suspensión de célula efectora descrita anteriormente (células efectoras : células blanco = 50 : 1), las cuales se hicieron reaccionar a 37°C durante 4 horas en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. La suspensión celular de cada pocillo se transfirió a una pantalla múltiple de 96 pocillos de 45 µm (Millipore) y se centrifugaron para recuperar los sobrenadantes del cultivo. La radioactividad (liberación de la muestra) filtrada de las células en estos sobrenadantes del cultivo se determina mediante un contador γ (AccuFLEX γ7000; Aloka Co.). La actividad citotóxica máxima (liberación máxima) de ADCC se definió como la actividad detectada en el sobrenadante cuando se agregó Triton-X 100 (Sigma) a una concentración final de 1%, mientras que la actividad de liberación espontánea (liberación espontánea) ADCC se definió como la actividad detectada en el sobrenadante cuando se agregó medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS en lugar de las células efectoras respectivamente. La lisis específica (%) como un indicador de la intensidad de ADCC se calculó por ([liberación de muestra]-[liberación espontánea])/(liberación máxima]-[liberación espontánea]) x 100 (TABLAS 11 y 12).

ADCC (lisis específica (%)) fue 4% o 3%, respectivamente, cuando se agregó IgG no inmune (concentración final de 1.5 µg/ml)o D-PBS, mientras que la ADCC de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos: Nec1-964-1 del Grupo I, Nec1-554-1,

558

Nec1-1302-2 y Nec1-769-2 del Grupo IV, Nec1-803-2 del Grupo VI, y Nec8-4116-8 del Grupo VII, demostró tasas tan significativamente altas como 12%, 19%, 15%, 12%, 15% y 17%, respectivamente, a 1.5 μg/μl. En particular, el anticuerpo Nec1-554-1 del Grupo IV y Nec8-4116-8 del Grupo VII presentaron una ADCC más potente que los otros anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos representada por la lisis especifica de 15% y 12%, respectivamente, en al concentración de anticuerpos final de 0.15 μg/μl.

TABLA 11

Anticuerpo	**Anticuerpo (μg/ml)**	**Lisis específica (%)**
IgG no inmune	1.5	4
D-PBS	-	3
Nec1-964-1	0.0015	-3
	0.015	2
	0.15	8
	1.5	12
Nec1-303-1	0.0015	-1
	0.015	1
	0.15	0
	1.5	3
Nec1-554-1	0.0015	0

559

Anticuerpo	Anticuerpo (µg/ml)	Lisis específica (%)
	0.015	7
	0.15	15
	1.5	19
Nec1-1302-2	0.0015	3
	0.015	3
	0.15	7
	1.5	15
Nec1-769-2	0.0015	4
	0.015	5
	0.15	10
	1.5	12
Nec1-1305-1	0.0015	3
	0.015	4
	0.15	4

S60

TABLA 12

Anticuerpo	Anticuerpo (µg/ml)	Lisis específica (%)
Nec1-1305-1	1.5	5
Nec1-141-3	0.0015	-3
	0.015	-2
	0.15	-3
	1.5	-2
Nec1-209-2	0.0015	-3
	0.015	-1
	0.15	2
	1.5	4
Nec1-909-1	0.0015	-1
	0.015	-1
	0.15	0
	1.5	3
Nec1-847-2	0.0015	1
	0.015	1
	0.15	8
	1.5	11

S-61

Anticuerpo	Anticuerpo (µg/ml)	Lisis específica (%)
Nec1-803-2	0.0015	0
	0.015	3
	0.15	8
	1.5	15
Nec8-4116-8	0.0015	2
	0.015	1
	0.15	12
	1.5	17

EJEMPLO 12

Actividad anti tumoral *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

En los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos obtenidos en el EJEMPLO 1, las actividades antitumorales de Nec1-803-2, Nec1-964-1, Nec1-303-2, Nec1-554-1SP3, Nec1-1302-2, Nec1-769-2, Nec1-1305-1, Nec1-141-3, Nec1-209-2, Nec1-909-1 y Nec1-847-2 se evaluaron en modelos de ratones lampiños trasplantados en forma subcutánea con la Línea celular cancerosa ovárica humana OV-90. Las muestras de anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano usadas fueron las preparadas por el procedimiento descrito en el EJEMPLO DE REFERENCIA 28. La línea celular OV-90 se sembró en un matraz de cultivo de tejido de 150 cm^2 (Corning) mediante una mezcla de medios en volúmenes iguales de MCDB105 (Sigma) suplementado con 15%

S62

de FBS (JRH) y Medio 199 (Sigma) y se incubaron a 37°C en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 5%. La suspensión de la línea celular OV-90 recogida en la fase logarítmica de crecimiento por un tratamiento de desprendimiento con tripsina-EDTA, se lavó 3 veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Invitrogen) mediante una operación de la centrífuga (1,000 rpm, 3 minutos). Las células obtenidas de este modo se resuspendieron en HBSS con una densidad de de 8×10^7 células/ml.

Después de que los ratones lampiños (BALB/cAJcl-nu/nu) (5 semanas, hembra), comprados en Nippon Crea, se domesticaron durante una semana, se inoculó la suspensión de la línea celular OV-90 por vía subcutánea en el área ventral con una dosis de 100 µl a cada animal. Diez días después de la inoculación de las células, se midieron el diámetro largo y el diámetro corto de la masa del tumor OV-90 con calibres y se calculó el volumen del tumor de acuerdo con la fórmula que se describe a continuación.

Volumen del tumor (mm^3) = diámetro largo x (diámetro corto)^2/2

A partir de los ratones lampiños trasplantados con la línea celular OV-90, se seleccionaron los ratones en los cuales se observó la masa tumoral trasplantada y se midió el peso de cada animal. Los ratones se agruparon de modo tal, que la media del volumen de masa tumoral de cada grupo era equivalente (aproximadamente 50 mm^3). En los días 10, 13, 17, 20, 24, 27 y 31 después de la inoculación celular, la solución del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano diluida en PBS a 0.15 mg/ml o se administró por vía intravenosa PBS a razón de 10 ml por kilo en al vena de la cola y al mismo tiempo se midió el volumen del tumor por el procedimiento descrito anteriormente. La actividad inhibidora del crecimiento del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano se evaluó por el cálculo del valor de T/C (Tratamiento/Control)

563.

sobre la base del volumen del tumor 4 semanas después del comienzo de la administración del fármaco, de acuerdo con la siguiente fórmula. Para la prueba de significación entre los grupos de administración, se usó la prueba de comparación de múltiples parámetros de Dunnett (paquete preclínico SAS Versión 5.0).

T/C (%) = [(Volumen de tumor aumentado en el grupo del anticuerpo desde el comienzo de la administración del fármaco)/(volumen de tumor aumentado en el grupo PBS desde el comienzo de la administración del fármaco] x 100

En los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos descritos anteriormente, algunos anticuerpos suprimieron fuertemente el crecimiento de la masa tumoral de la línea celular OV-90 y algunos suprimieron débilmente el crecimiento. El T/C de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos respectivos y los valores de la prueba de significación (valores de *P*) frene al grupo PBS se muestran colectivamente en la TABLA 13.

TABLA 13

	T/C (%)	**Valor de *P***
Nec1-803-2	47	0.0113
Nec1-964-1	62	
Nec1-303-2	102	
Nec1-554-1SP3	34	0.0028
Nec1-1302-2	63	
Nec1-769-2	83	

S64

	T/C (%)	Valor de *P*
Nec1-1305-1	104	
Nec1-141-3	72	
Nec1-209-2	94	
Nec1-909-1	74	
Nec1-847-2	81	

EJEMPLO 13

Análisis de dominios de unión de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

Como uno de los métodos de búsqueda de epítopes para los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos, las reactividades con la proteína deficiente en el dominio Ig1 (47-142 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3) y de la proteína deficiente en el dominio Ig2 (175-240 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3) de la nectina-2 se examinaron por FCM usando las células CHO-K1 donde estas proteínas se expresaron en forma transitoria. Específicamente, las suspensiones de las células CHO-K1, en las cuales el pEE12,4-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 18 y pADNc3,1(+)-Nectina-2ΔIg1 y pADNc3,1(+)-Nectina-2ΔIg2 preparados en el EJEMPLO DE REFERENCIA 30, o pADNc3,1(+) como control negativo están expresados en forma transitoria, se prepararon por el mismo procedimiento que en el EJEMPLO 9. Estas suspensiones celulares se agregaron a cada pocillo de una placa de extremo inferior en V de 96 pocillos a razón de 30 μl en cada uno, y varios

anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 o el anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 N2-No. 2 preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 14, el cual se diluyó en regulador FCM a 15 μg/ml, se agregaron a pocillo a razón de 20 μl (concentración final: 6 μg/ml) cada uno, seguido por la reacción en hielo durante una hora. Después se agregaron 200 μl del regulador de FCM a cada pocillo y se lavaron una vez por operación de la centrífuga, se agregaron 50 μl del anticuerpo secundario marcado Alexa488 diluido en el regulador de FCM a razón de 10 μg/ml y se mezclaron con los mismos, y luego la mezcla se hizo reaccionar en hielo durante una hora. El anticuerpo secundario marcado Alexa488 usado fue IgG anti-humana de cabra Alexa Fluor488 (H+L) para los anticuerpos humanos e IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor488 (H+L) (Invitrogen) para el anticuerpo de conejo. Las células de cada pocillo se lavaron dos veces con regulador FCM y luego se resuspendieron en 250 μl de regulador FCM. Mediante el citómetro de flujo MPL500 (BECKMAN COULTER), se midió la intensidad de fluorescencia de las células teñidas para determinar la proporción del valor medio de las intensidades de fluorescencia de los anticuerpos respectivos del grupo de anticuerpo primario al valor medio de las intensidades de fluorescencia del grupo de control negativo. La proporción se expresó en términos de la reactividad con cada una de las células CHO-K1 transfectadas con el gen y se muestran en las TABLAS 14 y 15. En las tablas, las reactividades con el pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg1-células transfectadas y pADNc3,1(+)-Nectina-2Δlg2-células transfectadas se expresan como delta-lg1 y delta-lg2, respectivamente. Cuando la proporción con el control negativo es 2 o más, se define que hay reactividad, mientras que la proporción al delta-lg1 era 2 o más y la proporción al delta-lg2 es 2 o menos, se consideró que el anticuerpo reconoce al dominio lg2 de la nectina-

SGG.

2; y cuando la proporción al delta-Ig1 era 2 o menos y la proporción al delta-Ig2 es 2 o más, se consideró que el anticuerpo reconoce al dominio Ig1 de la nectina-2. El dominio de unión (dominio del epítope) de un anticuerpos que muestra 2 o menos de dos relaciones descritas anteriormente se listó como "desconocido".

Los resultados sugirieron que los anticuerpos pertenecientes a los grupos de epítopes I y VII podrían reconocer el dominio Ig2 de la nectina-2. Los resultados también sugirieron que los anticuerpos pertenecientes a los grupos de epítopes V y VI podrían reconocer el dominio Ig1 de la nectina-2.

567

TABLA 14

Nombre	delta-Ig1	delta-Ig2	Dominio del epítope
Ninguno	1.0	1.1	
Policlonal Ab	4.5	8.9	
Nec1-102-1	1.0	4.6	Ig1
Nec1-141-3	1.0	2.6	Ig1
Nec1-202-1	1.0	1.4	desconocido
Nec1-244-3	1.0	2.9	Ig1
Nec1-308-2	1.1	1.1	desconocido
Nec1-313-1	1.0	1.0	desconocido
Nec1-333-1	4.2	1.1	Ig1
Nec1-410-3	2.9	1.3	Ig2
Nec1-460-1	0.8	2.8	Ig1
Nec1-464-1	1.0	3.5	Ig1
Nec1-503-3	1.0	1.0	desconocido
Nec1-738-2	1.0	5.1	Ig1
Nec1-755-5	1.0	4.8	Ig1
Nec1-803-2	1.0	5.3	Ig1
Nec1-888-11	1.0	1.0	desconocido
Nec1-909-1	1.0	3.5	Ig1

Nombre	delta-lg1	delta-lg2	Dominio del epítope
Nec1-919-1	1.0	6.9	lg1
Nec1-930-1	1.0	1.1	desconocido
Nec1-964-1	1.1	1.1	desconocido
Nec1-1044-4	2.2	0.8	lg2
Nec1-1302-2	4.1	1.1	lg2
Nec6-151-4	1.0	1.0	desconocido
Nec8-3410-1	1.0	1.3	desconocido
Nec8-3823-5	0.9	3.0	lg1
Nec8-4116-8	1.0	1.0	desconocido

S69

TABLA 15

Nombre	delta-Ig1	delta-Ig2	Dominio del epítope
Policlonal Ab	7.8	10.6	
Ninguno	1.0	1.0	
Nec1-554-1 SP3	4.3	1.0	Ig2
Nec1-1236-1 SP3	4.5	1.1	Ig2
Nec1-215-8 SP3	4.4	1.1	Ig2
Nec1-333-3 SP3	4.2	1.1	Ig2
Nec1-1044-4	2.9	1.1	Ig2
Nec1-554-1	3.6	1.0	Ig2
Nec1-215-8	4.3	1.1	Ig2
Nec1-1236-1	4.4	1.2	Ig2
Nec1-1613-3	5.1	1.1	Ig2
Nec1-333-3	3.6	1.1	Ig2
Nec1-326-7	1.1	1.3	Desconocido
Nec1-1138-1	4.0	1.0	Ig2
Nec1-1218-7	2.5	1.1	Ig2
Nec1-803-2	0.9	6.2	Ig1
Nec1-244-3	1.0	4.8	Ig1
Nec1-4116-8	0.9	1.0	Desconocido

S 70.

Nombre	delta-Ig1	delta-Ig2	Dominio del epítope
Nec1-103-1	1.0	1.3	Desconocido
Nec1-1302-2	3.5	1.2	Ig2
Nec1-1005-2	2.0	0.8	Ig2

EJEMPLO 14

Reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 con la nectina-2 de mono cinomolgo

Las reactividades cruzadas de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 con la nectina-2 de mono cinomolgo se examinaron por FCM mediante las células CHO-K1 en las que se expresa en forma transitoria la nectina-2 de mono cinomolgo. Por el mismo procedimiento que en el EJEMPLO 9, se prepararon las suspensiones de las células CHO-K1, en las cuales el pEE12,4-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 18 y pADNc3,1(+)-maNectina-2 preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 32, o pADNc3,1(+) como control negativo estaban expresadas en forma transitoria. Estas suspensiones celulares se agregaron a cada pocillo de una placa de extremo inferior en V de 96 pocillos a razón de 30 μl en cada pocillo y varios anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 o el anticuerpo policlonal de conejo anti-nectina-2 N2-No. 2 preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 14, como un control positivo, diluido en regulador FCM a 15 μg/ml, se agregaron al pocillo a razón de 20 μl (concentración final: 6 μg/ml) cada uno, seguido por la reacción en hielo durante una hora. Luego se agregaron 200 μl del regulador de FCM a cada pocillo y se lavaron una vez por operación de la

S41

centrífuga, se agregaron 50 µl del anticuerpo secundario marcado Alexa488 diluido en el regulador de FCM a razón de 10 µg/ml y se mezclaron con los mismos, y luego la mezcla se hizo reaccionar en hielo durante una hora. Como anticuerpos secundarios, se usó IgG anti-humana de cabra Alexa Fluor488 (H+L) para los anticuerpos humanos e IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor488 (H+L) (Invitrogen) para el anticuerpo de conejo, respectivamente. Después, las células de cada pocillo se lavaron dos veces con regulador FCM y luego se resuspendieron en 250 µl de regulador FCM. Mediante el citómetro de flujo MPL500 (BECKMAN COULTER), se midió la intensidad de fluorescencia de las células teñidas para confirmar las reactividades de unión de los anticuerpos respectivos. Para los anticuerpos respectivos, la proporción del valor medio de las intensidades de fluorescencia del grupo del anticuerpo primario al valor medio de las intensidades de fluorescencia del grupo control negativo se muestran en la TABLA 16. Los resultado revelaron que los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 anti-humanos preparados en el EJEMPLO 1 eran los anticuerpos que presentaban o no reactividad cruzada con la nectina-2 de mono cinomolgo. Los Nec1-554-1 pertenecientes al Grupo de epítopes IVb, Nec1-319-2 y Nec1-843-1 pertenecientes al Grupo de epítopes VI y Nec8-4116-8 pertenecientes al Grupo de epítopes VII demostraron la reactividad cruzada para la nectina-2 de mono cinomolgo. A la inversa, Nec1-111-3, Nec1-144-1, Nec1-209-2, Nec1-244-3, Nec1-316-1, Nec1-332-1, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-704-1, Nec1-730-4, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-843-1, Nec1-845-2, Nec1-903-1, Nec1-909-1, Nec1-918-2, Nec1-1214-5 y Nec8-4024-5 pertenecientes al Grupo de epítopes VI no demostraron reactividad cruzada para nectina-2 de mono cinomolgo.

542.

TABLA 16

TABLA	Nectina-2 humana	Nectina-2 de mono Cinomolgo
Anticuerpo no primario	0.8	0.9
Anticuerpo de control positivo	18.7	15.8
Nec1-111-3	29.9	1.3
Nec1-144-1	37.9	1.2
Nec1-209-2	45.8	1.6
Nec1-244-3	24.6	1.1
Nec1-316-1	38.4	1.1
Nec1-319-2	47.8	4.2
Nec1-332-1	51.7	1.3
Nec1-520-1	25.4	1.0
Nec1-530-1	40.5	1.0
Nec1-554-1	43.0	14.8
Nec1-704-1	22.2	1.3
Nec1-730-4	36.3	1.4
Nec1-803-2	48.6	1.1
Nec1-834-1	49.5	1.1

573

TABLA	Nectina-2 humana	Nectina-2 de mono Cinomolgo
Nec1-843-1	47.6	3.1
Nec1-845-2	42.9	1.7
Nec1-903-1	43.9	1.1
Nec1-909-1	43.7	1.7
Nec1-918-2	28.3	1.3
Nec1-1214-5	45.4	1.8
Nec8-4024-5	59.2	2.0
Nec8-4116-8	44.3	30.9

EJEMPLO 15

Reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano a mutantes de nectina-2 con una mutación introducida tipo mono cinomolgo

Las reactividades cruzadas de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 a mutantes de nectina-2 con una mutación introducida tipo mono cinomolgo se examinaron por FCM mediante las células CHO-K1 donde las mutantes de nectina-2 con una mutación introducida tipo mono cinomolgo estaban expresadas en forma transitoria. Por el mismo procedimiento que en el EJEMPLO 9, se prepararon las suspensiones de las células CHO-K1, en las cuales el pEE12,4-Nectina-2δ preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 18 y vector de expresión en la célula animal para nectina-2 con una mutación introducida tipo mono cinomolgo; pADNc3,1(+)-Nectina-2 (AN77-78PD), pADNc3,1(+)-Nectina-2 (G113R) o pADNc3,1(+)-

Nectina-2 (H128R) preparados en el EJEMPLO DE REFERENCIA 33, y pADNc3,1(+) como control estaban expresadas en forma transitoria. Estas suspensiones celulares se agregaron a cada pocillo de una placa de extremo inferior en V de 96 pocillos a razón de 30 μl en cada pocillo y varios anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 diluido en regulador de FCM regulador a 15 μg/ml, se agregaron al pocillo a razón de 20 μl (concentración final: 6 μg/ml) cada uno, seguido por la reacción en hielo durante una hora. Después se agregaron 200 μl del regulador de FCM a cada pocillo y se lavaron una vez por operación de la centrífuga, se agregaron 50 μl de IgG anti-humana de cabra Alexa Fluor488 (H+L) diluido en el regulador de FCM a razón de 10 μg/ml a la suspensión, y luego la mezcla se hizo reaccionar en hielo durante una hora. Después, las células de cada pocillo se lavaron dos veces con regulador FCM y luego se resuspendieron en 250 μl de regulador FCM. Mediante el citómetro de flujo MPL500 (BECKMAN COULTER), se midió la intensidad de fluorescencia de las células teñidas, respectivamente. La proporción del valor medio de las intensidades de fluorescencia del grupo del anticuerpo primario al valor medio de las intensidades de fluorescencia de los anticuerpos respectivos del grupo control negativo se muestran en la TABLA 17. Los resultados revelaron que los Nec1-111-3, Nec1-209-2, Nec1-244-3, Nec1-316-1, Nec1-332-1, Nec1-520-1, Nec1-530-1, Nec1-704-1, Nec1-730-4, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-843-1, Nec1-845-2, Nec1-903-1, Nec1-909-1, Nec1-918-2, Nec1-1214-5 y Nec8-4024-5 pertenecen al Grupo VI que se une igualmente a G113R y H128R, pero se unen a AN77-78PD. Los resultados sugieren la posibilidad de que estos anticuerpos monoclonales humanos podrían reconocer la región que contiene Ala^{77} o Asn^{78} de la nectina-2. A la inversa, Nec1-554-1 perteneciente al Grupo IVb, Nec1-144-1, Nec1-319-2 y

575

Nec1-843-1 perteneciente al Grupo VI, y Nec8-4116-8 perteneciente al Grupo VII se unen a AN77-78PD, G113R y H128R con igual afinidad que la nectina-2.

TABLA 17

	Nectina-2	AN77-78PD	G113R	H128R
Anticuerpo no primario	0.8	0.9	0.8	0.8
Anticuerpo de control positivo	18.7	20.3	17.9	19.8
Nec1-111-3	29.9	1.4	28.5	38.6
Nec1-144-1	37.9	19.3	30.9	27.2
Nec1-209-2	45.8	1.9	41.9	56.8
Nec1-244-3	24.6	1.1	23.3	29.6
Nec1-316-1	38.4	1.2	37.8	50.0
Nec1-319-2	47.8	6.9	43.8	61.1
Nec1-332-1	51.7	1.6	43.7	60.6
Nec1-520-1	25.4	1.0	22.5	31.6
Nec1-530-1	40.5	0.9	36.7	51.5
Nec1-554-1	43.0	44.2	38.7	51.5
Nec1-704-1	22.2	1.4	19.3	25.3
Nec1-730-4	36.3	1.0	32.4	42.2

	Nectina-2	AN77-78PD	G113R	H128R
Nec1-803-2	48.6	1.1	41.9	54.9
Nec1-834-1	49.5	1.2	45.9	55.8
Nec1-843-1	47.6	4.1	43.1	52.4
Nec1-845-2	42.9	2.3	40.1	51.9
Nec1-903-1	43.9	0.9	38.9	55.8
Nec1-909-1	43.7	1.4	32.5	45.5
Nec1-918-2	28.3	1.4	26.0	34.3
Nec1-1214-5	45.4	1.7	42.4	53.7
Nec8-4024-5	59.2	2.2	50.7	71.1
Nec8-4116-8	44.3	40.9	37.5	50.5

EJEMPLO 16

Análisis de los epítopes de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos pertenecientes al Grupo de Epítopes V y VI

En el EJEMPLO 13 se sugirió que los anticuerpos pertenecientes al Grupo de Epítopes V y VI podrían reconocer el dominio Ig1 de la nectina-2. Con el fin de identificar los epítopes de estos anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos con más detalle, se prepararon la proteínas recombinantes por una sustitución de aminoácidos única del dominio Ig1 de la nectina-2ED-Fc, y se examinaron las actividades de unión de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos frente a estas mutantes. El pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15 y los vectores de expresión en células de animales para mutantes sustituidas con un solo

aminoácido de nectina-2ED-Fc que se prepararon en el EJEMPLO DE REFERENCIA 34: pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q37A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(P40G), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q45A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(H55A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(V60A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Y64A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q71A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(A75G), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(P76G), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(A77G), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(N78A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(H79A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(Q80A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(N81A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K88A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(S95A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K109A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(E117A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(D122A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(H128A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(N137A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(F145A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(K147A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(V150A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc(M153A) o pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (T154A) se transfectaron a la línea celular 293F por medio de 293 Fectina (Invitrogen). Estas células se cultivaron en forma rotatoria a 37°C durante 3 días en un flujo gaseoso de dióxido de carbono al 8% para secretar la proteína de la nectina-2ED-Fc codificada por el plásmido descrito anteriormente y sus proteínas mutantes de aminoácido único [Q37A, P40G, Q45A, H55A, V60A, Y64A, Q71A, A75G, P76G, A77G, N78A, H79A, Q80A, N81A, K88A, S95A, K109A, E117A, D122A, H128A, N137A, F145A, K147A, V150A, M153A, T154A] en el sobrenadante del cultivo. El sobrenadante del cultivo se preparó a partir de cada suspensión celular por operación de la centrífuga y filtración con un filtro y se aportará para el posterior ELISA.

El anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano Nec8-4116-8 preparado en el EJEMPLO 1 se diluyó en regulador de carbonato

S78.

de sodio–bicarbonato de sodio 50 mM (pH 9.6) a una concentración de 5 μg/ml. La dilución se agregó a una inmunoplaca de mitad de pocillo de 96 pocillos (Costar) a razón de 50 μl por cada pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Después la solución de reacción se eliminó de cada pocillo, se agregaron 100 μl a cada pocillo de PBS suplementado con 2% de BSA para efectuar el bloqueo a 4°C durante toda la noche. La placa para ELISA preparada de este modo se lavó dos veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, una dilución 5 veces en PBS suplementado con 2% de BSA del sobrenadante del cultivo de la línea de células 293F, en el cual la proteína de la nectina-2ED-Fc (tipo salvaje) y la proteína con una sustitución de aminoácido único de la nectina-2ED-Fc estaban expresadas en forma transitoria, se agregó a razón de 50 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. También, el medio para la línea celular 293F se agregó a la misma placa como control negativo. Después de lavar esta placa 6 veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, el anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano preparado en el EJEMPLO 4 se diluyó en PBS suplementado con 0.2% de BSA a concentraciones de 5 ng/ml a 20 ng/ml y la dilución resultante se agregó a la placa a razón de 50 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar esta placa 6 veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, Avidina-HRP (Vector) diluido en PBS suplementado con 0.2% de BSA a 3,000 veces se agregó a razón de 50 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar esta placa 6 veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, se agregó solución de TMB (sustrato peroxidasa SureBlue Microwell MB) a la placa a razón de 50 μl por pocillo, la cual se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 minuto para la

formación de color. Luego, se agregó ácido sulfúrico 2N (Wako Pure Chemical) a razón de 50 µl por pocillo para terminar la reacción enzimática. Se midió la absorbancia (450 nm) de cada pocillo mediante una placa lectora (Multiskan BICHROMATIC). La reactividad de cada anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano biotinilado con el producto individual de sustitución de aminoácido único de nectina-2ED-Fc se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula.

Reactividad (% tipo de salvaje) = [absorbancia (producto de sustitución de aminoácido único) - absorbancia (control negativo)]/[absorbancia (tipo salvaje) - absorbancia (control negativo)] x 100

En la TABLA 18, los anticuerpos que se clasifican en el Grupo de Epítope VI del EJEMPLO 4 incluyen a los que tienen afinidad de unión disminuida al A75G, P76G y N78A y los que tienen afinidad de unión disminuida al A75G, P76G, N78A y N137A, lo cual sugiere que el primer grupo de anticuerpos podría reconocer los epítopes que contiene Ala^{75}, Pro^{76} y Asn^{78} y el último grupo del anticuerpo podría reconocer los epítopes que contiene Ala^{75}, Pro^{76}, Asn^{78} y Asn^{137}. También en los anticuerpos clasificados en el Grupo de epítope V del EJEMPLO 4, se observó la reducción de la reactividad con F145A, lo cual sugiere que estos anticuerpos podrían reconocer los epítopes que contiene Phe^{145}.

Tabla 18

Nombre clon	Nec9-211-2	Nec10-1959-2	Nec1-108-1	Nec1-141-3	Nec1-209-3	Nec1-803-2	Nec9-1512-2	Nec10-1009-1	Nec10-1709-3	Nec10-1961-1	Nec10-2005-1	Nec10-2459-2
Nectin2ED-Fc	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Q20A	95	99	102	107	117	96	91	100	99	91	87	89
Q45A	98	92	94	97	99	116	77	99	98	77	94	86
H55A	82	100	98	91	98	112	61	96	93	70	98	89
V60A	90	103	103	77	111	106	91	99	105	85	100	94
Y104A	87	78	96	80	104	122	91	97	101	83	100	94
Q71A	89	96	98	75	100	117	88	96	95	91	105	95
N28A	90	85	60	89	23	79	23	66	44	16	37	28
K86A	86	92	97	99	94	115	98	105	118	98	105	96
S69A	105	105	117	108	105	138	100	109	92	101	85	82
K109A	98	105	119	98	113	137	88	111	112	105	102	103
E117A	90	100	105	114	108	136	95	103	101	101	102	98
D122A	93	102	103	98	102	126	99	103	107	87	102	95
H129A	94	98	102	99	100	120	91	100	98	93	101	95
F145A	-2	-3	131	158	136	147	135	131	143	140	139	123
K147A	90	82	102	103	97	117	92	100	94	80	96	82
M150A	102	102	101	178	90	120	108	101	104	100	97	84

Nombre clon	Nec9-211-2	Nec10-1959-2	Nec1-141-3	Nec1-220-1	Nec1-530-1	Nec1-803-2	Nec1-916-2	Nec1-903-1	Nec10-1868-1	Nec10-1707-3	Nec10-2005-1	Nec1-209-3	Nec1-244-3	Nec1-624-1	Nec9-1512-2	Nec10-1861-1	Nec10-2459-2
Nectin2ED-Fc	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P10G	113	115	107	130	138	136	146	136	101	132	121	113	121	123	107	116	127
A25G	118	120	59	80	73	85	78	92	77	76	58	62	7	45	51	16	49
F28G	114	111	80	-2	-6	-9	-13	4	-4	-10	-6	-1	-18	-9	-2	-28	-14
A7G	102	113	101	99	103	116	102	96	91	91	82	102	110	123	90	104	75
N76A	104	114	127	57	66	84	59	73	84	63	49	35	12	37	29	29	35
H99A	114	120	142	145	135	155	157	150	114	152	132	104	141	127	118	133	142
Q80A	110	121	134	139	134	157	151	141	118	126	132	119	130	145	110	129	126
N81A	109	126	125	155	150	155	155	147	126	134	120	131	105	191	130	134	130
N37A	124	122	285	114	91	127	112	121	99	110	105	86	80	32	69	66	80
F45A	-1	-2	270	134	138	165	141	124	120	150	126	139	107	102	132	102	108
V150A	109	98	153	181	148	165	179	106	127	157	150	130	170	102	131	125	103
T154A	120	119	35	160	126	170	160	140	119	153	155	123	132	146	120	106	107

581

EJEMPLO 17

Análisis de los epítopes de anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos pertenecientes al Grupo de epítopes I y VII

Para identificar los epítopes de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en el EJEMPLO 1 en más detalle, se prepararon proteínas recombinantes por una sustitución de aminoácidos único del dominio de Ig2 de la nectina-2ED-Fc, y se examinaron las actividades de unión de estas proteínas. El pADNc3,1(+)-nectina-2ED-hFc preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 15 y vectores de expresión en células de animales para mutantes sustituidas con un solo aminoácido de nectina-2ED-Fc que se prepararon en el EJEMPLO DE REFERENCIA 35 : pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (Q165A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (K170A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (F173A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (P177G), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (I184A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (K186A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (L197A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (W202A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (E206A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (T212A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (T235A), pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (K239A) y pADNc3,1(+)-nectina-2ED-Fc (A249G) se transfectaron a la línea celular 293F por medio de 293 Fectina (Invitrogen). Estas células se cultivaron en forma rotatoria a 37°C durante 3 días en un flujo para secretar la proteína de la nectina-2ED-Fc codificada por el plásmido descrito anteriormente y sus proteínas mutantes de aminoácido único [Q165A, K170A, F173A, P177G, I184A, K186A, L197A, W202A, E206A, T212A, T235A, K239A, A249G] en el sobrenadante del cultivo. El sobrenadante del cultivo se preparó a partir de cada suspensión celular por operación de la centrífuga y filtración con un filtro y se aportará para el posterior ELISA.

El anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano Nec1-803-2

582.

preparado en el EJEMPLO 1 se diluyó en regulador de carbonato de sodio – bicarbonato de sodio 50 mM (pH 9.6) a una concentración de 5 μg/ml . La dilución se agregó a una inmunoplaca de mitad de pocillo de 96 pocillos (Costar) a razón de 50 μl por cada pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Después la solución de reacción se eliminó de cada pocillo, se agregaron 100 μl a cada pocillo de PBS suplementado con 2% de BSA para efectuar el bloqueo a 4°C durante toda la noche. La placa para ELISA preparada de este modo se lavó dos veces con PBS suplementado con 0.02% de Tween 20, una dilución, 20, 25 o 125 veces en PBS suplementado con 2% de BSA del sobrenadante del cultivo de la línea de células 293F, en el cual la proteína de la nectina-2ED-Fc (tipo salvaje) y la proteína con una sustitución de aminoácido único de la nectina-2ED-Fc estaban expresadas en forma transitoria, se agregó a razón de 50 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. También, el medio para la línea celular 293F se agregó a la misma placa como control negativo. Después de lavar esta placa 6 veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, el anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano preparado en el EJEMPLO 4 se diluyó en PBS suplementado con 0.2% de BSA a concentraciones de 1 ng/ml a 20 ng/ml y la dilución resultante se agregó a la placa a razón de 50 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar esta placa 6 veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, Avidina-HRP (Vector) diluido en PBS suplementado con 0.2% de BSA a 3,000 veces se agregó a razón de 50 μl por pocillo, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar esta placa 6 veces con PBS suplementado con 0.05% de Tween 20, se agregó solución de TMB (sustrato peroxidasa SureBlue Microwell MB, Kirkegaard &

583

Perry Laboratories, Inc.) a la placa a razón de 50 µl por pocillo, la cual se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 minuto para la formación de color. Luego, se agregó ácido sulfúrico 2N (Wako Pure Chemical) a razón de 50 µl por pocillo para terminar la reacción enzimática. Se midió la absorbancia (450 nm) de cada pocillo mediante una placa lectora (SPECTRAmax 340PC; Molecular Devices, Inc). La reactividad de cada anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano contra el producto con una sustitución de aminoácido único de nectina-2ED-Fc se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula. Los resultados se sintetizan en al TABLA 19.

Reactividad (% tipo de salvaje) = [absorbancia (producto de sustitución de aminoácido único) - absorbancia (control negativo)]/[absorbancia (tipo salvaje) - absorbancia (control negativo)] x 100

La actividad de unión de Nec1-964-1 pertenecientes al Grupo de epítopes I a los productos con sustitución de aminoácido único de la nectina-2ED-hFc disminuyó marcadamente con I184A, K186A y T212A, lo cual sugiere que este anticuerpo podría reconocer los epítopes que contienen Ile^{184}, Lys^{186} y Thr^{212}. A la inversa, la actividad de unión de Nec8-4116-8, Nec9-1004-1, Nec9-1236-1 y Nec9-1637-1 del grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VII a los productos con sustitución de aminoácido único de la nectina-2ED-hFc disminuyó marcadamente con F173A, lo cual sugiere que este anticuerpo podría reconocer los epítopes que contienen Phe^{173}.

TABLA 19

Nombre del clon	**Nec1-964-1**
Nectina 2-ED-Fc	100

584

Nombre del clon	Nec1-964-1
Q165A	89
K170A	95
F173A	104
P177G	104
I184A	33
K186A	16
L197A	98
W202A	102
E206A	100
T212A	21
T235A	104
K239A	104

EJEMPLO 18

Subagrupamiento de grupos de epítopes

Los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos preparados en los EJEMPLOS 1 y 8 se clasificaron en 7 grupos de epítopes como se muestran en el EJEMPLO 4. Los estudios posteriores revelaron que estos grupos se segmentaron adicionalmente. Por ejemplo, cuando las pruebas de inhibición competitiva realizadas en el EJEMPLO 4 se examinaron con más atención, se halló que un grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes IV muestra inhibición competitiva contra los

585.

anticuerpos del Grupo de epítopes VII. Se considera que estos anticuerpos son algo diferentes en el epítope de los anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes IV los cuales muestran inhibición no competitiva con anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VII, los cuales se subagruparon por conveniencia en el Grupo de epítopes IVb y el grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes IV que no muestra inhibición competitiva con el grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VII se subagruparon en el Grupo de epítopes IVa (TABLA 20). Además, un grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VI mostraron inhibición competitiva con el grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes I. Se considera que estos anticuerpos podrían reconocer epítopes algo diferentes de los anticuerpos del Grupo de epítopes VI pero que no muestra inhibición competitiva con el grupo de anticuerpos Grupo de epítopes I y por conveniencia, estos anticuerpos se subagruparon en el Grupo de epítopes VIa. Además, el grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VI del EJEMPLO 16 pero que no muestran inhibición competitiva con el Grupo de epítopes I se dividieron el grupo de anticuerpos que demostró afinidad de unión disminuida a A75G, P76G y N78A y el grupo de anticuerpos que demostró afinidad de unión disminuida a A75G , P76G, N78A y N137A a partir de los resultados del EJEMPLO 16. En consecuencia, por conveniencia, el grupo de anticuerpos que demostró afinidad de unión disminuida a A75G, P76G y N78A se subagrupó en el Grupo de epítopes VIb, y el grupo de anticuerpos que demostró afinidad de unión disminuida a A75G , P76G, N78A y N137A se subagrupó en el Grupo de epítopes VIc (TABLA 20). En el EJEMPLO 16, el anticuerpo Nec1-141-3 perteneciente al Grupo de epítopes VIa demostró sustancialmente la misma afinidad de unión a las mutantes de sustitución de aminoácidos que a la de tipo

salvaje, lo cual sugiere que estás diferentes en epítopes del grupo de los anticuerpos de epítope VIb o VIc. Además en el EJEMPLO 17, el grupo de anticuerpos que muestra afinidad de unión reducida al F173A se halló en los anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VII. De este modo, por conveniencia, el grupo de anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VII en el cual se demostró afinidad de unión reducida al F173A se subagrupó en el Grupo de epítopes VIIa y un grupo de otros anticuerpos pertenecientes al Grupo de epítopes VII se subagruparon en el Grupo de epítopes VIIa y Grupo de epítopes VIIb (TABLA 20).

TABLA 20

Nombre	Grupo de epítopes	Nombre	Grupo de epítopes
Nec1-102-1	VIa	Nec1-903-1	VIb
Nec1-105-1	VIa	Nec1-948-3	VIa
Nec1-111-3	IVa	Nec1-1005-2	IVa
Nec1-141-3	VIa	Nec1-1008-1	IVa
Nec1-209-3	VIc	Nec1-1044-4	IVb
Nec1-215-3	IVb	Nec1-1138-1	IVb
Nec1-231-1	IVa	Nec1-1142-1	IVa
Nec1-244-3	VIc	Nec1-1163-2	VIa
Nec1-303-2	IVa	Nec1-1218-7	IVb
Nec1-313-1	VIa	Nec1-1236-1	IVb

587

Nec1-326-7	IVb	Nec1-1239-2	IVa
Nec1-333-1	IVb	Nec1-1302-2	IVa
Nec1-341-10	IVa	Nec2-1409-12	IVa
Nec1-445-4	IVa	Nec2-1613-3	IVb
Nec1-458-6	IVa	Nec2-1625-4	VIa
Nec1-470-2	IVa	Nec3-1908-4	VIa
Nec1-520-1	VIb	Nec5-532-1	IVa
Nec1-522-2	VIa	Nec6-940-7	IVa
Nec1-530-1	VIb	Nec8-4116-8	VIIa
Nec1-538-3	VIa	Nec9-143-3	VIIb
Nec1-554-1	IVb	Nec9-136-1	VIIb
Nec1-555-5	IVa	Nec9-1004-1	VIIa
Nec1-726-1	IVa	Nec9-1018-1	VIIb
Nec1-759-9	VIa	Nec9-1236-1	VIIa
Nec1-765-1	VIa	Nec9-1502-2	VIc
Nec1-803-2	VIb	Nec9-1637-1	VIIa
Nec1-812-4	IVa	Nec10-1666-1	VIb
Nec1-831-4	IVa	Nec10-1707-3	VIb
Nec1-834-1	VIc	Nec10-1861-1	VIc
Nec1-835-1	IVa	Nec10-2005-1	VIb
Nec1-845-2	VIb	Nec10-2439-2	VIc

584

EJEMPLO 19

Secuencias base y secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos

Las secuencia base y secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales anti-nectina-2 humanos Nec1-244-3, Nec1-530-1, Nec1-554-1, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-845-2, Nec1-903-1 y Nec8-4116-8 preparados en el EJEMPLO 1 se determinaron por los siguientes procedimientos. Específicamente, el ADNc se preparó por medio del sistema de síntesis de ADNc directa de células SuperScriptIII (Invitrogen). El hibridoma productor de anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 humano establecido en el EJEMPLO 1 (3 a 10 x 10^5) se suspendió en 80 μl de PBS y 1 μl de la suspensión se agregó en hielo a un tubo de PCR cargado con 1 μl de RNaseOUT y 10 μl de regulador de resuspensión, que se calentó a 75°C durante 10 minutos. Después, se agregaron 1.6 μl de regulador 10 x DNaseI y 5 μl de DNasaI en hielo y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, el tubo se colocó de vuelta en hielo y se agregaron 1.2 μl de EDTA 25 mM al mismo, seguido por calentamiento a 70°C durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 2 μl de Oligo$(dT)_{20}$ y 1 μl de una mezcla de dNTP 10 mM. Después de calentar a 70°C durante 5 minutos, el tubo se dejó reposar en hielo durante 2 minutos y se agregaron 6 μl de regulador 5 x RT, 1 μl de RNasa OUT, 1 μl de SuperScriptIII RT y 1 μL de DTT 0.1 mM. La mezcla resultante se hizo reaccionar a 50°C durante 50 minutos y además a 85°C durante 5 minutos para sintetizar ADNc.

Mediante el ADNc anterior sintetizado de cada hibridoma como molde, se realizó la PCR para amplificar los genes de la cadena H mediante el cebador 176 (SEQ ID NO: 176) y cebador

589

177 (SEQ ID NO: 177) y los genes de la cadena L mediante el cebador 178 (SEQ ID NO: 178) y cebador 179 (SEQ ID NO: 179), en el caso de Nec1-244-3, Nec1-530-1, Nec1-803-2, Nec1-834-1, Nec1-845-2 y Nec1-903-1; el gen de la cadena H mediante el cebador 177 y cebador 178 y el gen de la cadena L mediante el cebador 180 (SEQ ID NO: 180) y cebador 179, en el caso de Nec8-4116-8; y el gen de la cadena H mediante el cebador 181 (SEQ ID NO: 181) y cebador 177 y el gen de la cadena L mediante el cebador 182 (SEQ ID NO: 182) y cebador 179, en el caso de Nec1-554-1; respectivamente. En esta reacción, la solución de reacción estaba compuesta de 4 μl del ADNc descrito anteriormente, 1 U de KOD-Plus- (TOYOBO), 0.3 μM de cada cebador, 200 μM de los dNTP, $MgSO_4$ 1 mM y regulador de PCR 10 x (TOYOBO), para preparar 50 μl totales. La PCR se realizó por la reacción a 94°C durante 2 minutos y luego se repitió 30 veces el ciclo ajustado para incluir 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Los genes de la cadena H se sometieron otra vez a la misma PCR que se describió anteriormente, mediante 1 μl de la solución de reacción después de la finalización de la mencionada anteriormente PCR como un molde. El producto de PCR se purificó mediante el kit de purificación de PCR (QIAGEN) y se eluyó con 75 μl de regulador EB.

La reacción de PCR para la secuencia de bases del ADN se llevó a cabo por medio de una solución de 20 μl de volumen compuesta de 10 μl de solución de producción de PCR purificada descrita anteriormente, 8 μl de de la mezcla del ciclo de secuenciación del kit de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing ABI PRISM (Applied Biosystems) y 3.2 pmol del cebador 183 (SEQ ID NO: 183). La PCR se realizó a 96°C durante 2 minutos y luego se repitió 25 veces el ciclo ajustado para incluir 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos. La

solución de reacción se purificó por reemplazo con 30 µl de agua destilada usando Sefadex G-75 Superfine (GE healthcare, BioSciences). Este producto de reacción se aplicó al analizado de secuencia de ADN ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) y se determinó la secuencia de ADN sobre la base del manual adjunto del analizador. La secuencia de aminoácidos de cada anticuerpo se dedujo a partir de la secuencia de ADN en forma convencional.

Los resultados revelaron que la región variable de la cadena H de Nec1-244-3 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 191) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 187, la región variable de la cadena L de Nec1-244-3 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 199) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 195, la región variable de cadena H de Nec1-530-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 207) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 203, la región variable de cadena L de Nec1-530-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 215) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 211, la región variable de cadena H de Nec1-554-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 223) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 219, la región variable de cadena L de Nec1-554-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 231) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 227, la región variable de cadena H de Nec1-803-2 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 239) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 235, la región variable de cadena L de Nec1-803-2 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 247) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 243, la región variable de cadena H de Nec1-834-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 255) que codifica la secuencia

591

de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 251, la región variable de cadena L de Nec1-834-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 263) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 259, la región variable de cadena H de Nec1-845-2 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 271) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 267, la región variable de cadena L de Nec1-845-2 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 279) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 275, la región variable de cadena H de Nec1-903-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 287) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28, la región variable de cadena L de Nec1-903-1 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 295) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 291, la región variable de cadena H de Nec8-4116-8 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 303) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 299, y la región variable de cadena L de Nec8-4116-8 consistió en la secuencia base (SEQ ID NO: 311) que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 307.

Las combinaciones de los CDR1 a 3 (secuencia de aminoácidos) de las cadenas pesadas de los anticuerpos obtenidos de aquí se enumeran en la TABLA 21. Las combinaciones de los CDR1 a 3 (secuencia de aminoácidos) de sus cadenas livianas se enumeran en la TABLA 22. Los CDR1 a 3 (secuencia bases) de las cadenas pesadas de los anticuerpos obtenidos de aquí con secuencias base que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la TABLA 21 y sus combinaciones se enumeran en la TABLA 23. Los CDR1 a 3 (secuencia bases) de las cadenas livianas de los anticuerpos obtenidos aquí son secuencias base que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la TABLA 22

y sus combinaciones se enumeran en la TABLA 24.

Además, las secuencias de aminoácidos y secuencias base de las regiones variables de los anticuerpos obtenidos aquí se enumeran en la TABLA 25.

Como referencia, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena H y cadena L de estos anticuerpos se muestran en la FIG. 1 y las secuencias base respectivas se muestran en las FIGS. 2 y 3.

S93

TABLA 21

Secuencia de CDR (secuencia de aminoácidos) de la cadena pesada del anticuerpo anti-nectina-2

Clon No.	Cadena pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	SYYWS (184)	YIYYSGSTNHNPSLKS (185)	DGGDDYNYGMDV (186)
Nec1-530-1	SYYWT (200)	YVYYSGSTNYNPSLKS (201)	DPGEDYYYGMDV (202)
Nec1-554-1	SYNMN (216)	SISSSSSYIYYADSVKG (217)	DYYGSGTYILFDY (218)
Nec1-803-2	SYYWT (232)	YIYYSGSTNSNPSLKS (233)	DPGEDYNYGMDV (234)
Nec1-834-1	SYYWS (248)	YIYYSGSTNYNPSLKS (249)	DAGEDYSYGMDV (250)
Nec1-845-2	SYYWT (264)	YIYYSGSTNYNPSLKS (265)	DPGEDYNYGMDV (266)
Nec1-903-1	SYXWT (280)	YIYYSGSTNYNPSLKS (281)	DPGEDYNYGMDV (282)
Nec8-4116-8	SYYWT (296)	YIFYSGSTNYNPSLKS (297)	GIAGMDV (298)

Los números entre paréntesis después de las secuencias indican los números de secuenciación.

S94

TABLA 22

Secuencia de CDR (secuencia de bases) de la cadena liviana del anticuerpo anti-nectina-2

Clon No.	Cadena liviana		
	CDR1	**CDR2**	**CDR3**
Nec1-244-3	RASQGISSXLA (192)	DASSLXS (193)	QQXNSYPXT (194)
Nec1-530-1	RASQGISSXLA (208)	DASSLES (209)	QQFNSYPRT (210)
Nec1-554-1	RASQSIGSSLH (224)	YASQSFS (225)	HQSRSLPIT (226)
Nec1-803-2	RASQGISSALA (240)	DASSLES (241)	QQFNSYPRT (242)
Nec1-834-1	RASQGISSALA (256)	DASSLES (257)	QQFNSYRT (258)
Nec1-845-2	RASQGISSALA (272)	DASSLES (273)	QQFNSYPRT (274)
Nec1-903-1	RASQGISSALA (288)	DASSLES (289)	QQFNSYPRT (290)
Nec8-4116-8	RASQSIGSSLH (304)	YASQSFS (305)	HQSRSLPIT (306)

Los números entre paréntesis después de las secuencias indican los números de secuenciación.

595.

TABLA 23

Secuencia de CDR (secuencia de bases) de la cadena pesada del anticuerpo anti-nectina-2

Clone No.	Cadena pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	AGTTACTACTGGAGC (188)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACCACAAC CCCTCCCTCAAGAGT (189)	GATGGTGGGGACGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (190)
Nec1-530-1	AGTTACTACTGGACC (204)	TATGTCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (205)	GACCCTGGGGAAGAC TACTACTACGGTATG GACGTC (206)
Nec1-554-1	AGCTATAACATGAAC (220)	TCCATTAGTAGTAGTAG TAGTTACATATACTACG CAGACTCAGTGAAGGGC (221)	GATTACTATGGTTCG GGGACTTATTATCTC TTTGACTAC (222)
Nec1-803-2	AGTTACTACTGGACC (236)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTCCAAC CCCTCCCTCAAGAGT (237)	GACCCTGGGGAAGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (238)
Nec1-834-1	AGTTACTACTGGAGC (252)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (253)	GATGCTGGGGAGGAC TACTCCTACGGTATG GACGTC (254)
Nec1-845-2	AGTTACTACTGGACC (268)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (269)	GACCCTGGGGAAGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (270)
Nec1-903-1	AGTTACWACTGGACC (284)	TATATCTATTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (285)	GACCCTGGGGAAGAC TACAACTACGGTATG GACGTC (286)
Nec8-4116-8	AGTTACTATTGGACC (300)	TATATCTTTTACAGTGG GAGCACCAACTACAACC CCTCCCTCAAGAGT (301)	GGTATAGCAGGTATG GACGTC (302)

Los números entre paréntesis después de las secuencias indican los números de secuenciación.

TABLA 24

Secuencia de CDR (secuencia base) de la cadena liviana del anticuerpo anti-nectina-2

Clone No.	Cadena liviana		
	CDR1	CDR2	CDR3
Nec1-244-3	CGGGCRAGTCAGGGCATTAGCAGYGSKTTAGCC (96)	GATGCMTCCAGTTTGSAAAGT (97)	CAACAGTWTAATAGTTACCCTYGGACG (98)
Nec1-530-1	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGSTTTAGCC (12)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (13)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (14)
Nec1-554-1	CGGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGCTTACAC (28)	TATGCTTCCCAGTCCTTCTCA (29)	CATCAGAGTAGGAGTTTACCGATCACC (30)
Nec1-803-2	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC (44)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAG (45)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (46)
Nec1-834-1	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC (60)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (61)	CAACAGTTTAATAGTTACCGGACG (62)
Nec1-845-2	CGGGCRAGTCAGGGYATTAGCAGYGCTTTAGCC (76)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (77)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (78)
Nec1-903-1	CGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC (92)	GATGCCTCCAGTTTGGAAAGT (93)	CAACAGTTTAATAGTTACCCTCGGACG (94)
Nec8-4116-8	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCC (308)	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT (309)	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGTACACT (310)

Los números entre paréntesis después de las secuencias indican los números de secuenciación.

597

TABLA 25

Secuencia de bases y secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpos anti-nectina-2

Clon No.	Secuencia base		Secuencia de aminoácidos	
	Cadena pesada	Cadena liviana	Cadena pesada	Cadena liviana
Nec1-244-3	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 187	SEQ ID NO: 195
Nec1-530-1	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 211
Nec1-554-1	SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 219	SEQ ID NO: 227
Nec1-803-2	SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 247	SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 243
Nec1-834-1	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 251	SEQ ID NO: 259
Nec1-845-2	SEQ ID NO: 271	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 275
Nec1-903-1	SEQ ID NO: 287	SEQ ID NO: 295	SEQ ID NO: 283	SEQ ID NO: 291
Nec8-4116-8	SEQ ID NO: 303	SEQ ID NO: 311	SEQ ID NO: 299	SEQ ID NO: 307

El anticuerpo monoclonal humano contra la proteína que

comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo, se puede usar en forma segura por ejemplo como un agente para prevenir/tratar, cáncer (por ej., (por ej., cáncer colorrectal, cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer de las vías biliares, cáncer del bazo, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, tumor sanguíneo.) (con preferencia un agente para prevenir/tratar el cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer pancreático, etc.), un inductor de apoptosis de las células cancerosas, un inhibidor del crecimiento de las células cancerosas, un inductor de cambios en el ciclo celular de las células cancerosas, un agente citotóxico dependiente de las células efectoras contra las células cancerosas y similares.

EJEMPLO DE REFERENCIA 36

Generación de anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos

(i) Una proteína de fusión de nectina-2ED-hFc recombinante (solución de PBS 1.6 mg/ml) preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 16 en el cual se expresaron transitoriamente un vector de expresión de célula animal que codifica la proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2δ (Met^{1}-Gly^{361}) y la región Fc del anticuerpo IgG_1 humano (Pro^{217}-Lys^{447}) en una línea celular 293F humana (Invitrogen); o (ii) una proteína de fusión nectina-2ED-FLAG recombinante (2 mg/ml de solución de PBS) preparada en el EJEMPLO DE REFERENCIA 13 en el cual se expresaron transitoriamente un vector de expresión de célula animal que codifica la proteína de fusión del dominio extracelular de nectina-2δ (Met^{1}-Gly^{361}) y FLAG marcada (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-

599

Asp-Asp-Lys) en una línea celular 293F (Invitrogen), se mezcló con adyuvante de Freund completo (Difco) en volúmenes iguales para preparar emulsiones, respectivamente.

Se inyectaron estas emulsiones a cada uno de cinco ratones KM (10 semanas, 12 semanas, machos; Kirin Brewery) por vía subcutánea e intracutánea para la inmunización primaria, respectivamente en 10 a 50 μg por cada/animal. Para la segunda y posterior inmunización, también se inyectó una emulsión preparada por la mezcla de la proteína nectina-2ED-hFc recombinante con adyuvante de Freund incompleto (Difco) en volúmenes iguales cada 2 semanas como refuerzo. Además, la línea celular recombinante FM3A (#60-6) (cf. PCT/JP2006/320429) que expresa en forma estable nectina-2δ o la línea celular recombinante NS0 (#2-75) que expresa en forma estable nectina-2δ se cultivó en un matraz. Se recogieron y lavaron estas células para eliminar los componentes del suero, seguido por el tratamiento con mitomicina C (Wako Pure Chemical) a 37°C durante 30 minutos. Las dos líneas celulares tratadas con mitomicina C se lavaron 3 veces con 10 ml de PBS y luego se resuspendieron en PBS a 2 x 10^7células/ml. La suspensión se inyectó por vía intraperitoneal a cada uno de los cinco ratones KM Kirin Brewery, 10-12 semanas, macho) a razón de 1 x 10^7células/500 μl en forma repetida una vez por semana.

Asimismo, cada uno de los cinco ratones KM (12 semanas, macho) se inmunizaron para inmunización primaria con una emulsión preparada por mezclado de la mencionada proteína recombinante Nectina-2ED-hFc o la mencionada proteína recombinante Nectina-2ED-FLAG con adyuvante de Freund completo en volúmenes iguales por vía subcutánea e intracutánea a razón de 10 a 50 μg de cada una/animal, respectivamente. Una semana después de la inmunización primaria, se inyectó por vía intraperitoneal una línea celular FM3A recombinante tratada con

600

mitomicina C que expresa nectina-2δ a razón de 1 x 10^7 células cada/500 μl para refuerzo. Para la tercera inmunización, se inmunizó por vía subcutánea e intracutánea con una emulsión preparada o la mezcla de nectina-2ED-hFc recombinante o nectina-2ED-FLAG recombinante con adyuvante de Freund incompleto en volúmenes iguales respectivamente y al mismo tiempo, se inyectó por vía intraperitoneal una línea celular FM3A recombinante tratada con mitomicina C que expresa nectina-2δ (#60-6) a razón de 1 x 10^7 células cada/500 μl una vez por semana. Para la cuarta y posterior inmunización, una línea celular FM3A recombinante tratada con mitomicina C que expresa nectina-2δ (#60-6) sólo se inyectó por vía intraperitoneal a razón de 1 x 10^7 células cada/500 μl por el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Antes de la inmunización y después de la inmunización, se recogió sangre del fondo ocular de todos los ratones bajo anestesia etérea para preparar antisueros y se determinó la titulación de anticuerpos en el suero por el método de citometría de flujo que se describe a continuación. Es decir, las suspensiones celulares (PBS) de la línea celular recombinante CHO (#43-2) que expresa en forma estable nectina-2δ (cf. PCT/JP2006/320429) y la línea celular símil-CHO se dispensaron en forma separada en tubos de polipropileno a razón de 5 x 10^5 células/tubo, respectivamente y luego se eliminó PBS por centrifugación (1,200 rpm x 5 minutos). Estos restos celulares se resuspendieron en 50 μl de cada uno de los antisueros de ratón mencionados diluidos 100 veces con PBS que contiene 1% de BSA y 10% de FBS y reaccionaron en hielo en la oscuridad durante 30 minutos. Después se agregaron 200 μl de PBS a los desechos celulares y la mezcla se centrifugó (1,200 rpm x 5 minutos), se retiró el sobrenadante por aspiración. Los restos celulares se resuspendieron en 50 μl de una solución de IgG (H+L)

601

Alexa 488 anti-humana (Invitrogen) diluida 100 veces con PBS que contienen 1% de BSA y 10% de FBS y se hacen reaccionar en hielo en la oscuridad durante 30 minutos. Después la suspensión celular se lavó también 3 veces con PBS, los restos celulares se resuspendieron en 200 μl de PBS. Se analizaron las intensidades de fluorescencia de las células respectivas con el citómetro de flujo MPL500 (BECKMAN COULTER) para preparar un gráfico que tiene una abscisa que representa la intensidad de fluorescencia y una ordenada que representa el recuento de células, a través de las cuales se compararon las titulaciones de anticuerpos del antisuero.

En los ratones KM en los cuales se confirmó un aumento suficiente de la titulación de anticuerpos séricos por el procedimiento descrito antes, los ratones que habían sido inmunizados con nectina-2ED-hFc recombinante o nectina-2ED-FLAG recombinante se inyectaron en la vena de la cola con estos antígenos proteicos y los ratones que habían sido inmunizados con la línea celular recombinante que expresa en forma estable nectina-2δ se inyectaron por vía intraperitoneal con la misma línea celular. Tres días después de la inmunización final, los ratones se sangraron hasta la muerte y se extirpó el bazo. Las células del bazo de de ratón obtenidas se mezclaron en una proporción 5 : 1 con células de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1 (P3U1) (ATCC), que habían sido previamente adaptadas a un medio en el cual 1 vial de 8-azaguanina (HybriMax, Sigma-Aldrich) por 500 ml de FBS 10% suplementado con un medio Daigo T (una mezcla de medio de mezcla nutriente F-12 (HAM) (Invitrogen) y medio de Dulbecco modificado por Iscove (Invitrogen) en volúmenes iguales, suplementado con una solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen), piruvato de sodio (Invitrogen) y L-glutamina (Invitrogen)), de este modo se produce la fusión mediante polietilenglicol (PEG) 1.500 (Roche Diagnostics). Las

602

manipulaciones de fusión celular se realizaron de acuerdo con el manual adjunto con el reactivo. Las células después de la fusión se resuspendieron en medio Daigo T suplementado con 10% de FBS y 10% de BM Condimed H1 (Roche Diagnostics), se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos a razón de 5 x 10^4 células del bazo /100 µl/pocillo y se incubaron a 37°C durante un día en una corriente gaseosa de dióxido de carbono al 5%. Posteriormente, se agregó medio Daigo T (medio de selección HAT) suplementado con hipoxantina 0.1 mM, aminopterina 0.4 µM, timidina 0.016 mM (HAT), 10% de BM Condimed H1 y 10% de FBS a razón de 100 µl/pocillo, seguido por una incubación adicional a 37°C en una corriente gaseosa de dióxido de carbono al 5% con el reemplazo dos veces de 3/4 del sobrenadante del cultivo con un medio de selección HAT fresco cada 3 días.

El sobrenadante del cultivo en el que se observó crecimiento de colonias durante los días 7 a 14 de la incubación se examinó por un ELISA celular que usa la línea celular CHO que expresa en forma estable nectina-2δ (#43-2) o la línea celular símil-CHO para establecer el hibridoma productor de anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos. En otras palabras, la línea celular CHO recombinante que expresa en forma estable nectina-2δ (#43-2) y la línea celular símil CHO se incubaron en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos cargada con medio DMEM de selección GS que contiene 10% de suplementos FBS y GS dializados. Después se retiró el cultivo del sobrenadante de la placa donde cada línea celular se volvió confluente por aspiración, se agregaron 200 µl a cada una/pocillo de PBS(+) que contiene 2% de FBS a la misma y se incubó en hielo en la oscuridad durante una hora. Después se retiró el sobrenadante de cada pocillo por aspiración, se agregaron 50 µl a cada pocillo del sobrenadante del cultivo de hibridoma y se hicieron reaccionar en hielo en la oscuridad durante 2 horas.

603

Después se lavó esta placa una vez con PBS(+) enfriado a 4°C, se agregaron 100 µl a cada pocillo de conjugado de cadena específica de IgG (H+L) anti-humana peroxidasa (GOAT) (CALBIOCHEM) diluido 3,000 veces con PBS(+) que contiene 2% de FBS y se hizo reaccionar en hielo en la oscuridad durante 2 horas. Después la placa se lavó 3 veces con PBS(+) enfriada a 4°C, se agregaron 100 µl a cada pocillo de una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (SureBlue Microwell sustrato de peroxidasa TMB; Kirkegaard & Perry Laboratories) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos para producir formación de color. Al agregar 100 µl a cada pocillo de ácido sulfúrico 2N (Wako Pure Chemical), la reacción enzimática terminó. Se midió la absorbancia (450 nm) de cada pocillo mediante una placa lectora (Multiskan BICHROMATIC; Thermo Electron Co.), y se determinó que las que muestran absorbancia de 0.5 o más en la placa en la que se sembraron células CHO con expresión recombinante de nectina-2 que expresan nectina-2 y las que muestran absorbancia de menos de 0.3 en la placa en que sembraron líneas celulares símil-CHO eran pocillos positivos. Se seleccionaron los hibridomas que producen anticuerpos IgG con especificidad y afinidad particularmente alta y se resuspendieron en medio Daigo T que contiene 10% de FBS y 10% de BM Condimed H1. Las células se sembraron en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos a razón de 0.5 células/pocillo y los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas, que fueron confirmados como monoclones por observación microscópica, se examinaron otra vez por el ELISA celular descrito anteriormente para establecer 258 clones de hibridoma que producen anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano.

Cada hibridoma que produce anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano obtenido de este modo se cultivó en un matraz cargado con 100 ml de medio Daigo T que contiene 10% de FBS

604

Ultra low IgG (Invitrogen), y el sobrenadante del cultivo se centrifugó (1,200 rpm x 5 minutos) para dar el sobrenadante. Después se agregaron 200 µl de Sefarosa Proteína A FF (GE Healthcare Bio-sciences) equilibrada con PBS a estos sobrenadantes del cultivo, el anticuerpo se adsorbió en el mismo mientras mientras se agitaba suavemente durante toda la noche a 4°C. Este transportador de proteína A se recuperó y lavó con PBS por una operación de centrifugado. Luego, la fracción IgG se eluyó con 1.2 ml de glicina 0.1 M-HCl (pH 3.0) que contiene NaCl 0.3 M. Inmediatamente, este eluido se neutralizó con Tris 1 M-HCl (pH 8.0), y el regulador se remplazó con PBS por ultraconcentración mediante una membrana de ultrafiltración (Vivaspin 6, peso molecular límite, 10,000; Sartorius), que se usó en las siguientes caracterizaciones in vitro como preparación de anticuerpo monoclonal humano anti-nectina-2.

El clon del hibridoma Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682), Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), Nec1-1044-4, Nec8-3517-11 o Nec8-3704-7, que produce el anticuerpo usado en la presente invención, se obtuvo a partir de los clones del hibridoma que produce anticuerpos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 37

Selección de anticuerpos de unión a nectina-2 en forma competitiva con el anticuerpo usado en la presente invención

Los anticuerpos monoclonales de unión a nectina-2 en forma competitiva con el anticuerpo usado en la presente invención, que se preparó en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36, se seleccionaron por los procedimientos descritos a continuación.

605.

En primer lugar, para realizar la reacción de inhibición de la unión competitiva entre los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos, los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos obtenidos del EJEMPLO DE REFERENCIA 36 se biotinilaron. Es decir, se agregaron 10 μg del anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano a 50 μl del regulador WS unido al kit de marcación de biotina-NH2 (Dojindo) y la mezcla se concentró casi a sequedad por ultrafiltración mediante Microcon YM50 (MILLIPORE). Al residuo líquido, se agregaron sucesivamente en este orden 50 μl de regulador de reacción unido al kit de marcación de biotina-NH2 y una solución de 4 μl de biotina reactiva NH2 disuelta en 50 μl de DMSO, seguido por la reacción a 37°C durante 10 minutos. El regulador de la mezcla de reacción se reemplazó otra vez con regulador WS por ultrafiltración para preparar anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos biotinilados. Estos anticuerpos se usaron para el ensayo que se describe a continuación.

A la placa FMAT (placa de 384 pocillos de extremo inferior negro/transparente con tapa; Applied Biosystems), se agregaron 5 μl del anticuerpo usado en la presente invención (anticuerpo monoclonal anti-nectina-2 no marcado), que se preparó en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36, diluido en PBS que contiene 2% de FBS a razón de 25 μg/ml, 15 μl de una suspensión de células (2 x 10^5 células/ml) de la línea celular CHO de expresión en forma estable de nectina-2δ (#43-2) en PBS que contiene 2% de FBS y 5 μl del conjugado estreptavidina-Alexa Flúor 647 (Invitrogen) y se mezclaron entre sí, seguido por la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de agregar 5 μl de anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano biotinilado preparados por el procedimiento descrito anteriormente, diluido en PBS que contiene 2% de FBS a razón de 0.5 μg/ml a cada pocillo, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Para las pruebas de

control, se proporcionaron pocillos en los que se agregó PBS con 2% de FBS en lugar de anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal no marcado. Esta reacción de inhibición competitiva frente a la unión de nectina-2 se examinó en todas las combinaciones de los anticuerpos provistos para la biotinilación y los anticuerpos usados en la presente invención. La placa se ajustó en el sistema de detección celular Applied Biosystems 8200 (Applied Biosystems) para medir la intensidad de fluorescencia total (valor total de FL1) de cada pocillo. Se calculó el índice de inhibición competitiva en la combinación de cada anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano de acuerdo con la fórmula mostrada a continuación.

Índice de inhibición de unión competitiva = (1-A/B) x 100

A: Valor de FL1 total del pocillo en que el anticuerpo marcado se agrega a un anticuerpo de ensayo

B: Valor de FL1 total del pocillo en el que no se agrega anticuerpo a un anticuerpo de ensayo

Por este procedimiento, por ejemplo, se obtuvieron en forma selectiva Nec1-1044-4 y Nec1-1302-2 a partir de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos preparados en, por ej., el EJEMPLO DE REFERENCIA 36 como los anticuerpos que se unen a nectina-2 competitivamente con Nec1-554-1 para la unión. Asimismo, por ej., se obtuvieron en forma selectiva Nec8-3704-7 y Nec8-3517-11 como los anticuerpos que se unen a nectina-2 competitivamente con Nec8-4116-8.

La TABLA 26 muestra la índice de inhibición entre Nec8-4116-8 y nectina-2 biotinilada por los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos. La TABLA 27 muestra el índice de inhibición de la unión competitiva por los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos frente a la unión a Nec1-554-1 y nectina-2 biotinilada.

Los anticuerpos Nec1-1044-4 y Nec1-1302-2 y Nec8-3704-7 y

661

Nec8-3517-11, que se unen competitivamente a nectina-2 con los anticuerpos seleccionados de este modo usados en la presente invención, han sido depositados, respectivamente.

TABLA 26

Anticuerpo biotinilado	Anticuerpo no marcado	Índice de inhibición (%)
Nec8-4116-8	Nec8-3517-11	91
Nec8-4116-8	Nec8-3704-7	98
Nec8-4116-8	Nec8-4116-8	98
Nec8-4116-8	Nec1-244-3	0
Nec8-4116-8	Nec1-845-2	22
Nec8-4116-8	Nec1-520-1	48
Nec8-4116-8	Nec1-769-2	0

TABLA 27

Anticuerpo biotinilado	Anticuerpo no marcado	Índice de inhibición (%)
Nec1-554-1	Nec1-554-1	87
Nec1-554-1	Nec1-1044-4	92
Nec1-554-1	Nec1-1302-2	82
Nec1-554-1	Nec1-244-3	0
Nec1-554-1	Nec1-845-2	0
Nec1-554-1	Nec1-520-1	41

Nec1-554-1	Nec1-769-2	0

EJEMPLO DE REFERENCIA 38

Preparación a gran escala de anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal recombinante humano (Nec8-4116-8)

El anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal recombinante humano (Nec8-4116-8) se preparó por expresión en forma estable de un gen para el anticuerpo de la línea celular CHOK1SV (Lonza Biologics). La preparación del anticuerpo que había sido purificado del sobrenadante de cultivo de hibridoma productor de anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano Nec8-4116-8 mediante una columna de Proteína A, se aplicó a la electroforesis en gel SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras para separar las cadena H y L. Las proteínas de las cadenas H y L se transfirieron en la membrana de PVDF. Debido a que la cadena H fue piroglutamatada con frecuencia en el extremo N-terminal, la eliminación del piroglutamato se realizó mediante Pfu Piroglutamato Aminopeptidasa (Takara Bio). Las secuencias de aminoácidos N-terminales de las proteínas transferidas en la membrana PVDF se secuenciaron mediante un secuenciador de proteínas (ABI). Las secuencias de aminoácidos N-terminales obtenidas (cadena H (SEQ ID NO: 312) y la cadena L (SEQ ID NO: 313)) se sometieron a búsqueda de homología mediante la base de datos V BASE (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) de este modo se selecciona la línea germinal (VH4, VKIIIA27) coincidente con las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente y las secuencias de base (cadena H (SEQ ID NO: 314) y cadena L (SEQ ID NO: 315)) que codifica el extremo N-terminal de las secuencias señal putativas de las mismas. Se agregaron el sitio de restricción enzimático Hind III y la secuencia Kozak a estas secuencias señal para sintetizar los oligo ADN como cebadores delanteros (cadena H (SEQ ID NO: 176) y cadena L (SEQ ID NO: 180)). Por otra parte, los oligo ADN con el

609

sitio de restricción enzimático EcoRI agregado corriente debajo de los codones de terminación de los genes para las cadenas de anticuerpo H y L se sintetizaron como cebadores inversos, respectivamente (cadena H (SEQ ID NO: 316) y cadena L (SEQ ID NO: 317)). Mediante un ADNc preparado a partir de la célula de hibridoma (Nec8-4116-8) mediante el sistema de síntesis de ADNc directa de células SuperScriptIII (Invitrogen) como molde, se realizó la PCR mediante los cebadores descritos anteriormente para obtener los genes de longitud completa para las cadenas H y L del anticuerpo Nec8-4116-8, respectivamente.

El gen de la cadena H y el gen de la cadena H obtenidos de este modo se digirieron con enzimas de restricción HindIII y EcoRI, respectivamente. Los fragmentos de ADN purificados se insertaron en el vector de expresión de célula animal pEE6.4 (Lonza Biologics) y el vector de expresión de célula animal pEE12.4 (Lonza Biologics) que contienen el gen de glutamina sintetasa (GS) en el sitio Hind III - EcoR I, respectivamente para construir el vector de expresión de la cadena H y el vector de expresión de la cadena L. Asimismo, el fragmento insertado en el gen de la cadena H y el fragmento insertado en el gen de la cadena L, que se escindieron de los vectores respectivos por digestión con enzimas de restricción Not I/Sal I, se aislaron y luego se ligaron entre sí para construir el vector del gen doble que porta el gen de GS, gen de la cadena H y gen de cadena L juntos. Este vector se transfectó en las células CHOK1SV de acuerdo con el manual de Biología Lonza y el transfectante se cultivó por selección en una placa cultivo de tejidos de 96 pocillos que contiene metionina sulfoximina (MSX). Se cuantificaron las concentraciones de anticuerpo humano en los sobrenadantes del cultivo a partir de los pocillos donde se cultivó una colonia única por ELISA para seleccionar 22 líneas celulares recombinantes que expresan en forma estable Nec8-4116-8. Estas

610

líneas celulares se expandieron y luego se adaptaron a un cultivo de suspensión mediante medio libre de suero. De este modo, se estableció la línea celular CHOK1SV (Clon 25-78) que expresa en forma estable Nec8-4116-8, la cual muestra un excelente crecimiento celular y productividad del anticuerpo.

La línea celular CHOK1SV descrita anteriormente se expandió en un medio ProCHO5 (Cambrex) que contiene sulfoximina de metionina 25 μM (MP Biomedicals) y suplemento GS (50 x, SAFC) y se cultivó a 37°C en una corriente gaseosa de dióxido de carbono al 5%, seguida por un cultivo de agitación durante 32 días mediante un jarro fermentador de 2 litros (37°C, concentración de oxígeno disuelto de 2 mg/l, pH de 6.7-7.0, velocidad de rotación de 80 rpm, flujo de aire de 100-300 ml/min). Durante este período, se agregaron solución de glucosa, solución de L-glutamina, suplemento GS (50 x, SAFC), aminoácidos (50 x, SAFC), oligoelementos (10,000 x, SAFC), vitaminas (100 x, SAFC) e hidrolizado de soya (50 x, SAFC) sobre la base del análisis de componentes del medio. El cultivo principal terminó en el punto de tiempo cuando la viabilidad celular disminuyó a aproximadamente 10%.

Después, se centrifugó el sobrenadante del cultivo (7,460 x g, 20 minutos) para recoger el sobrenadante. El sobrenadante se concentró mediante una membrana de ultrafiltración (membrana Hydrosart, peso molecular límite de 10,000; Sartorius AG) para el regulador de intercambio al regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0) que contiene NaCl 0.15 M. El concentrado se centrifugó (14.300 x g, 20 minutos) para obtener el sobrenadante, que se microfiltró adicionalmente (Stericup HV, 0.45 μm; Millipore) para obtener el concentrado. El concentrado se adsorbió en una columna de sefarosa Proteína A (22 mm ID x 79 mm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0)

611

que contiene NaCl 0.15 M. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de columna del mismo regulador, la fracción de anticuerpo adsorbida en la columna se eluyó con regulador de citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0). Inmediatamente después de esto, la fracción se neutralizó con la adición de volumen 1/10 de regulador Tris 1 M-HCl (pH 9.0) y se concentró mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 30,000; Millipore). El concentrado se aplicó en la columna Superdex 200 (26 mm ID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con PBS y se eluyó con el mismo regulador para dar la fracción de monómero de anticuerpo. La fracción de anticuerpo se pasó a través de una columna ActiClean EtOX (25 mm ID x 59 mm, Sterogene Bioseparations), que había sido equilibrado con PBS, para eliminar endotoxinas, seguido por concentración mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 10,000; Millipore). El concentrado se filtró asépticamente (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) para dar la preparación de Nec8-4116-8 recombinante purificada. El anticuerpo purificado obtenido de este modo demostró la pureza de 95% o más alto en gel SDS-PAGE de la filtración HPLC mediante la columna Superdex 200. El contenido de endotoxina de la preparación de anticuerpo se halló que es 0.1 de anticuerpo EU/mg o menos de los análisis mediante Endospecy ES-24S Set (Seikagaku Corp.) y Toxicolor DIA Set (Seikagaku Corp.).

EJEMPLO DE REFERENCIA 39

Preparación a gran escala de anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humana (Nec1-554-1)

Se preparó el anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humana Nec1-554-1 a partir de dicha línea celular de hibridoma productora de anticuerpo (Nec1-554-1) por el siguiente procedimiento. Después de expandir el cultivo de la línea celular de hibridoma

612

Nec1-554-1 a 37°C en una corriente gaseosa de dióxido de carbono en el medio IH (medio de Dulbecco modificado por Iscove : Ham F-12 = 1:1, solución de aminoácido no esencial MEM 0.1 mM, solución de piruvato de sodio 1 mM, solución de L-glutamina 2 mM; Invitrogen) que contiene 10% de FBS (Ultra-Low IgG, Invitrogen), las células se expandieron adicionalmente con un medio adaptación primario (medio IH: medio de hibridoma CD con una solución del medio de Hibridoma con L-glutamina 8 mM = 1:1, Invitrogen), seguido por la incubación durante un día. Las células se expandieron adicionalmente con el medio para el cultivo principal (medio IH: medio de hibridoma CD con solución de L-glutamina 8 mM = 1:3, Invitrogen), seguido por la incubación durante 5 a 7 días (37°C, concentración de oxígeno disuelto de 2 mg/l, pH 7.0, velocidad de rotación de 40 rpm). Durante este período, se agregaron solución de glucosa y solución de L-glutamina sobre la base del análisis del componente del medio. El cultivo principal se terminó en el punto de tiempo cuando la viabilidad celular disminuyó a aproximadamente 50%.

Después, se recogió el sobrenadante del cultivo por centrifugación (7,460 x g, 20 minutos) y se concentró mediante una membrana de ultrafiltración (membrana Hydrosart, peso molecular límite, 10,000; Sartorius AG) para intercambiar el regulador a regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0) que contiene NaCl 0.15 M, seguido por centrifugación (14.300 x g, 20 minutos) para obtener el sobrenadante. El sobrenadante se microfiltró (Stericup HV, 0.45 μm; Millipore) para obtener el concentrado. El concentrado se adsorbió en una columna de sefarosa de Proteína A (22 mm ID x 79 mm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0) que contiene NaCl 0.15 M. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de columna del mismo regulador, la fracción de anticuerpo adsorbida en la columna se

613.

eluyó con regulador de citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0). Inmediatamente después, la fracción se neutralizó por la adición de un volumen 1/10 de regulador Tris 1 M-HCl (pH 9.0).

Se halló que la fracción de anticuerpo purificado obtenida de este modo era excepcionalmente una mezcla de los anticuerpos activos e inactivos. En consecuencia, la fracción del anticuerpo se diluyó 3 veces con regulador de acetato de sodio 20 mM (pH 5.0) y se adsorbió adicionalmente a una columna de intercambio catiónico SP-5PW (21.5 mm ID x 150 mm, Toso) equilibrado con regulador de acetato de sodio 20 mM (pH 5.0) que contiene NaCl 100 mM. Después de lavar la columna con aproximadamente 2 volúmenes de columna del mismo regulador, se separaron los anticuerpos de las 3 fracciones eluidas con un gradiente lineal de la concentración de NaCl desde 100 mM a 300 mM durante 70 minutos. Las actividades de unión de estas fracciones eluidas a la nectina-2 se determinaron por ELISA mediante la proteína pectina-2-ED-Fc inmovilizada recombinante y se recolectó la fracción de anticuerpo (SP3) que demuestra la actividad específica mayor como fracción Ab de anti-nectina-2. El eluido del anticuerpo así obtenido se concentró mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 30,000; Millipore), y se aplicó sobre una columna Superdex 200 (26 mm ID x 60 cm, GE Healthcare Biosciences) equilibrada con PBS y eluida con el mismo regulador para dar la fracción monomérica del anticuerpo. La fracción se pasó a través de la columna ActiClean EtOX (25 mm ID x 59 mm, Sterogene Bioseparations) equilibrado con PBS para eliminar la endotoxina seguido por la concentración mediante una membrana de ultrafiltración (AmiconUltra, peso molecular límite, 10,000; Millipore) y el concentrado además se filtró asépticamente (Millex GV, 0.22 μm; Millipore) para dar el anticuerpo purificado. El anticuerpo purificado se denominó Nec1-554-1 SP3.

614

El anticuerpo purificado obtenido de este modo demostró la pureza de 95% o más en SDS-PAGE y HPLC con filtración en gel mediante la columna Superdex 200. Se halló que el contenido de endotoxina en la preparación de anticuerpo era de 0.1 EU/mg de anticuerpo o menos por los análisis mediante h Endospecy ES-24S Set (Seikagaku Corp.) y Toxicolor DIA Set (Seikagaku Corp.).

EJEMPLO 20

ADCC de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos contra la línea celular de cáncer de mama

Se midió la ADCC de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos Nec1-554-1, Nec1-1044-4, Nec1-1302-2, Nec8-4116-8, Nec8-3517-11y Nec8-3704-7 preparados en los EJEMPLOS DE REFERENCIA 36 y 37. Se usó una línea celular de cáncer de mamas humano MDA-MB-231 (ATCC) cultivado de acuerdo con el procedimiento descrito en el EJEMPLO 22 como células blanco y se usaron células mononucleares de sangre periférica humana congeladas disponibles en el comercio (ALLCELLS) que habían sido cultivadas durante la noche en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con IL-2 recombinante humana 0.1 nM (DIACLONE Research), 2-mercaptoetanol 55 μM (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (JRH) (de aquí en delante denominado como medio 10% de FBS/RPMI 1640) como células efectoras. Como Nec1-1044-4, Nec1-1302-2, Nec8-4116-8, Nec8-3517-11 y Nec8-3704-7, se usaron las preparaciones de anticuerpo descritas en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36 y la preparación del anticuerpo (Nec1-554-1 SP3) descrita en el EJEMPLO DE REFERENCIA 39 se usó como Nec1-554-1, respectivamente.

Se recogió la línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-231 en fase de crecimiento logarítmico y se agregaron 250 μCi de $Na_2{}^{51}CrO_4$ (GE Healthcare Bio-sciences) a razón de 1.0×10^6

células, seguido por la incubación a 37°C durante una hora con el fin de marcar las células con ^{51}Cr. La línea celular se lavó 4 veces con medio 10% de FBS/RPMI 1640 y se resuspendió a razón de 1 x 10^5 células/ml en medio 10% de FBS/RPMI 1640. Luego se realizó el ensayo de ADCC por agregado de 50 µl (5 x 10^3 células) de la suspensión celular obtenida de este modo y 25 µl de una solución en la que los anticuerpos descritos anteriormente se diluyeron en 10% de FBS/RPMI 1640 a concentraciones finales de 0.0015 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.15 µg/ml y 1.5 µg/ml, a cada pocillo de una placa de 96 pocillos RMC (BIOBIK). Se agregó el mismo volumen de IgG humana no inmune (concentración final de 0.0015 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.15 µg/ml y 1.5 µg/ml) o D-PBS (Invitrogen) como control negativo para detectar actividad no específica cuando no se agregó anticuerpo (No Ab). Después de incubar estas placas en hielo durante una hora, se agregaron 2.5 x 10^5 células a cada pocillo de la suspensión celular descrita anteriormente (células efectoras: células blanco = 50 : 1) y se hacen reaccionar a 37°C durante 4 horas en una corriente gaseosa de dióxido de carbono al 5%. Se midió la pérdida de reactividad (liberación de la muestra) de las células en cada pocillo al sobrenadante del cultivo por un contador de centelleo (TopCount NXT). Es decir, la suspensión celular después de la reacción se transfirió a un Multi-screen 0.45 µm (Millipore) y se centrifugó para recoger los sobrenadantes del cultivo. Después, 50 µl de cada sobrenadante del cultivo se mezclaron con 150 µl/pocillo de MicroScinti-40 en una placa de 96 pocillos (Costar) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió la fluorescencia de cada pocillo por un contador de centelleó (TABLA 33). La máxima citotoxicidad (liberación máxima) de ADCC se definió como la radioactividad detectada cuando se agregó Triton-X 100 (Sigma) a una concentración final del 1%, mientras que la actividad de liberación espontánea (liberación espontánea)

se definió como la radioactividad detectada cuando se agregó medio al 10% de FBS/RPMI 1640 en lugar de las células efectoras. La lisis específica (%) como indicador de la intensidad de ADCC se calculó por ([liberación de muestra]-[liberación espontánea]) / ([liberación máxima]-[liberación espontánea]) x 100.

TABLA 33

Anticuerpo	**Anti-cuerpo (µg/ml)**	**Lisis especí-fica (%)**
IgG no inmune	0.0015	7
	0.015	9
	0.15	8
	1.5	7
No Ab	-	6
Nec1-554-1	0.0015	8
	0.015	11
	0.15	16
	1.5	16
Nec1-1044-4	0.0015	10
	0.015	9
	0.15	9

617

Anticuerpo	Anti-cuerpo (µg/ml)	Lisis especí-fica (%)
	1.5	14
Nec1-1302-2	0.0015	8
	0.015	8
	0.15	11
	1.5	14
Nec8-4116-8	0.0015	8
	0.015	11
	0.15	15
	1.5	16
Nec8-3517-11	0.0015	10
	0.015	12
	0.15	15
	1.5	17
Nec8-3704-7	0.0015	9
	0.015	12
	0.15	16
	1.5	16

618

EJEMPLO 21

ADCC de anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos contra la línea celular de cáncer de próstata humana, línea celular de cáncer de pulmón humana y línea celular de cáncer de sangre humana

Se midieron las ADCC de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos Nec1-554-1 y Nec8-4116-8 preparados en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36. La línea celular de cáncer de pulmón humana NCI-H1299, línea celular de cáncer de próstata humana Du145 y línea celular de cáncer de sangre humana U937 se usaron como células blanco y las células mononucleares de sangre periférica humana congeladas disponibles en el comercio (ALLCELLS) que habían sido cultivadas durante la noche en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con IL-2 recombinante humana 0.1 nM (DIACLONE Research), 2-mercaptoetanol 55 μM (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (JRH) (de aquí en delante denominado como medio 10% de FBS/RPMI 1640) como células efectoras. La línea celular de cáncer de pulmón humana NCI-H1299, línea celular de cáncer de próstata humana Du145 y línea celular de cáncer de sangre humana U937 se compraron en ATCC. Estas líneas celulares se incubaron de acuerdo con la modificación del método recomendado por ATCC. La preparación de anticuerpo descrita en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36 y la preparación del anticuerpo (Nec1-554-1 SP3) descrita en el EJEMPLO DE REFERENCIA 39 se usaron como Nec8-4116-8 y Nec1-554-1, respectivamente.

Se recolectaron las células cancerosas en fase de crecimiento logarítmico y se agregaron 250 μCi de $Na_2{}^{51}CrO_4$ (GE Healthcare Bio-sciences) a 1.0 x 10^6 células, seguido por la incubación a 37°C durante una hora con el fin de marcar las células con ^{51}Cr. Estas líneas celulares se lavaron 4 veces con medio al

10% de FBS/RPMI 1640 y se resuspendieron a razón de 1 x 10^5 células/ml en medio al 10% de FBS/RPMI 1640. Luego se realizó el ensayo de ADCC por agregado de 50 µl (5 x 10^3 células) de la suspensión celular obtenida de este modo y 25 µl de una solución en la que los anticuerpos descritos anteriormente se diluyeron en 10% de FBS/RPMI 1640 a concentraciones finales de 0.0015 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.15 µg/ml y 1.5 µg/ml, a cada pocillo de una placa de 96 pocillos RMC (BIOBIK). Se agregó el mismo volumen de IgG humana no inmune (concentración final de 0.0015 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.15 µg/ml y 1.5 µg/ml) o D-PBS (Invitrogen) como control negativo para detectar actividad no específica cuando no se agregó anticuerpo (No Ab). Después de incubar estas placas en hielo durante una hora, se agregaron 2.5 x 10^5 células a cada pocillo de la suspensión celular descrita anteriormente (células efectoras:células blanco = 50:1) y se hacen reaccionar a 37°C durante 4 horas en una corriente gaseosa de dióxido de carbono al 5%. Se midió la pérdida de reactividad (liberación de la muestra) de las células en cada pocillo al sobrenadante del cultivo por un contador de centelleo (TopCount NXT) por el mismo procedimiento descrito en el EJEMPLO 20 (TABLA 34). La máxima citotoxicidad (liberación máxima) de ADCC se definió como la radioactividad detectada cuando se agregó Triton-X 100 (Sigma) a una concentración final del 1%, mientras que la actividad de liberación espontánea (liberación espontánea) se definió como la radioactividad detectada cuando se agregó un medio al 10% de FBS/RPMI 1640 en lugar de las células efectoras. La lisis específica (%) como indicador de la intensidad de ADCC se calculó por ([liberación de muestra]-[liberación espontánea])/([liberación máxima]-[liberación espontánea]) x 100.

620.

TABLA 34

Anticuerpo	Anti-cuerpo (µg/ml)	Lisis específica para NCI-H1299 (%)	Lisis específica para Du145 (%)	Lisis específica para U937 (%)
IgG no inmune	0.0015	18	9	26
	0.015	23	9	27
	0.15	22	10	27
	1.5	20	9	27
No Ab	-	16	7	21
Nec1-554-1	0.0015	19	10	28
	0.015	24	13	27
	0.15	28	14	36
	1.5	26	16	34
Nec8-4116-8	0.0015	21	9	28
	0.015	23	12	28
	0.15	28	15	36
	1.5	29	15	32

EJEMPLO 22

Actividad antitumoral in vivo de los anticuerpos anti-nectina-2

621

monoclonales humanos (modelos de ratón SCID para el tratamiento de metástasis de pulmón con línea celular de cáncer de mamas humana MDA-MB-231)

Las actividades antitumorales de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos (Nec8-4116-8 y Nec1-554-1) preparados en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36 se evaluaron en un modelo de SCID de ratón para el tratamiento de metástasis de pulmón con línea celular de cáncer de mamas humana MDA-MB-231 (comprada en ATCC). Las preparaciones de anticuerpo Nec8-4116-8 y Nec1-554-1 usadas fueron las preparadas por los procedimientos descritos en los EJEMPLO DE REFERENCIA 38 y 39, respectivamente. La línea celular MDA-MB-231 se sembró en una placa de cultivo de tejido de 10 cm (Corning) mediante Leibovitz's L-15 (Invitrogen) que contiene 10% de FBS (Thermo Electron) y se incubó a 37°C sin gas dióxido de carbono. La suspensión celular de MDA-MB-231 recolectada en la fase de crecimiento logarítmico por desprendimiento con tratamiento de tripsina-EDTA se lavó tres veces con solución salina de Hank (HBSS) (Invitrogen) por operación centrífuga (1,000 rpm, 3 minutos). Las células así obtenidas se resuspendieron en HBSS a una densidad de 5×10^6 células/ml.

Los ratones SCID (C.B-17/Icr-scid/scidJcl) (5 semanas, hembras), comprados en CLEA Japón, Inc., se inocularon por la vena de la cola con la suspensión celular MDA-MB-231 descrita anteriormente a razón de 200 µl a cada animal. El día 14 después de la inoculación celular, cada animal se pesó y luego se los dividió en 5 ratones por grupo para hacer su peso medio equivalente en cada grupo (aproximadamente 20 g). En la prueba para evaluar la actividad antitumoral de Nec1-554-1, se inyectó la preparación de Nec1-554-1 SP3 diluida en PBS a 0.3 mg/ml o 0.03 mg/ml o PBS en la vena de la cola a razón de 10 ml por kg en los días 14, 21, 28,

622

35, 42 y 49 después de la inoculación de células. Por otra parte, en la prueba para evaluar la actividad antitumoral de Nec8-4116-8, se inyectó la preparación de Nec8-4116-8 diluida en PBS a 0.3 mg/ml o 0.03 mg/ml o PBS en la vena de la cola a razón de 10 ml por kg en los días 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 después de la inoculación de células.

Se evaluaron las actividades anti-tumorales de Nec1-554-1 y Nec8-4116-8 por recuento del número de colonias cancerosas formadas en los pulmones en el sitio diafragmático. Las diferencias de significación entre los grupos de ensayo se evaluaron por la prueba de comparación múltiple de parámetros de Dunnett (SAS Preclinical Package Versión 5.0).

Tanto Nec1-554-1 como Nec8-4116-8 inhibieron el crecimiento e las células MDA-MB-231 en el pulmón en forma significativa ($p<0.0001$) a cualquier nivel de dosis. El número de colonias cancerosas (media $\pm$ desviación estándar) en el grupo Nec1-554-1 y el grupo PBS además de valores de la prueba de significación (valores P) se muestran en la TABLA 35, y el número de colonias cancerosas (media $\pm$ desviación estándar) en el grupo Nec8-4116-8 y el grupo PBS además de valores de la prueba de significación (valores P) se muestran en la TABLA 36.

TABLA 35

	Número de colonias cancerosas	**Valor P**
PBS	234±33	-
Nec1-554-1, 3 mg/kg	31±24	<0.0001
Nec1-554-1,	20±6	<0.0001

623.

0.3 mg/kg		

TABLA 36

	Media del número de colonias cancerosas	**Valor P**
PBS	152±46	-
Nec8-4116-8 3 mg/kg	18±10	<0.0001
Nec8-4116-8 0.3 mg/kg	41±23	<0.0001

EJEMPLO 23

Actividad antitumoral in vivo de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos (modelos de ratón SCID para el tratamiento de la línea celular de cáncer de mamas humana MDA-MB-231 trasplantadas por vía subcutánea)

Las actividades antitumorales de Nec8-4116-8 y Nec1-554-1 preparados en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36 se evaluaron en un modelo de SCID de ratón para el tratamiento de la línea celular de cáncer de mamas humana MDA-MB-231 trasplantadas por vía subcutánea (comprada en ATCC). Las preparaciones de anticuerpo Nec8-4116-8 y Nec1-554-1 usadas fueron las preparadas por los procedimientos descritos en los EJEMPLO DE REFERENCIA 38 y 39, respectivamente. La línea celular MDA-MB-231 se sembró en una placa de cultivo de tejido de 10 cm (Becton Dickinson) mediante Leibovitz's L-15 (Invitrogen) que contiene 10% de FBS g (Hyclone) y un volumen 1/40 de bicarbonato de sodio al 7.5% (Invitrogen), seguido por la incubación a 37°C en una corriente gaseosa de dióxido de carbono al 5% (Thermo Electron). La

624

suspensión celular de MDA-MB-231 recolectada en la fase de crecimiento logarítmico por desprendimiento con tratamiento de tripsina-EDTA se lavó tres veces con solución salina de Hank (HBSS) (Invitrogen) por operación centrífuga (1,000 rpm, 3 minutos). Las células así obtenidas se resuspendieron en un volumen equimolar de HBSS y Matrigel (BD Biosciences) para obtener una suspensión de células a una densidad de 3×10^7 células/ml.

Después los ratones SCID (C.B-17/Icr-scid/scidJcl) (5 semanas, hembras), comprados en CLEA Japón, Inc., se domesticaron durante una semana, la suspensión celular MDA-MB-231 descrita anteriormente se inoculó por vía subcutánea en le área ventral a una dosis de 100 µl cada/animal. Diez días después de la inoculación de células, se midieron con calibres el diámetro largo y el diámetro corto de la masa tumoral de MDA-MB-231 y el volumen del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula que se describe a continuación.

Volumen del tumor (mm^3) = diámetro largo x (dímetro corto)^2/2

Cada ratón SCID inoculado con las células MDA-MB-231 se pesó y luego se dividió en grupos para hacer la media del volumen de la masa del tumor equivalente (aproximadamente 170 mm^3) de cada grupo. Los días 28, 31, 35, 38 y 42 después de la inoculación de células, se administró por vía intravenosa en la vena de la cola la solución de anticuerpo Nec8-4116-8 o Nec1-554-1 SP3 diluida en PBS a 3 mg/ml o PBS a razón de 10 ml por kg, y al mismo tiempo, se midió el volumen del tumor por el procedimiento descrito anteriormente. Se evaluaron las actividades inhibidoras del crecimiento de Nec8-4116-8 y Nec1-554-1 por el cálculo del valor de T/C (Tratamiento/Control), sobre la base del volumen del tumor 3 semanas después del comienzo de la administración del fármaco,

de acuerdo con la siguiente fórmula. Las diferencias de significación entre los grupos de ensayo se evaluaron por la prueba de comparación múltiple de parámetros de Dunnett (SAS Preclinical Package Versión 5.0).

T/C (%) = [(volumen del tumor aumentado en el grupo de anticuerpo del comienzo de la administración del fármaco)/(volumen del tumor aumentado en el grupo de PBS del comienzo de la administración del fármaco)] x 100

La FIG. 4 muestra los cambios del volumen del tumor con el paso del tiempo después del trasplante subcutáneo de las líneas celulares cancerosas.

Los valores de T/C del grupo Nec8-4116-8 y Nec1-554-1 fueron 39.2% y 38.7%, respectivamente, lo que indica que ambos anticuerpos inhibieron significativamente el crecimiento del tumor inducido por la línea celular MDA-MB-231 ($p<0.0001$) (FIG. 4).

EJEMPLO 24

Actividad antitumoral in vivo de los anticuerpos anti-nectina-2 monoclonales humanos (modelos de ratón lampiño para el tratamiento de metástasis hepática con una línea celular de cáncer de ovario humana OV-90)

Se evaluaron las actividades antitumorales in vivo del anticuerpo anti-nectina-2 monoclonal humano (Nec8-4116-8) preparado en el EJEMPLO DE REFERENCIA 36 en modelos de ratón lampiño para el tratamiento de metástasis hepática con una línea celular humana de cáncer de ovario OV-90 (adquirida en ATCC). La preparación del anticuerpo Nec8-4116-8 usado fue uno de los preparados por los procedimientos descritos en el EJEMPLO DE REFERENCIA 38. La línea celular OV-90 se sembró en un matraz de cultivo de 150 cm^2 (Corning) cargado con un medio, que se preparó por disolución del medio MCDB 105 (Sigma) en 1 litro de agua destilada, pH ajustado a 7.5, filtrada en forma aséptica, se

626

mezclan 500 ml de este medio MCDB 105 con 500 ml del medio 199 (Sigma) y se agregan 150 ml de FBS (Thermo Electron) al mismo, seguido por la incubación a 37°C en una corriente gaseosa de dióxido de carbono 5%. La suspensión de células OV-90 recolectada en la fase de crecimiento logarítmica por desprendimiento con el tratamiento de tripsina-EDTA se lavó 3 veces con solución salina de Hank equilibrada (HBSS) (Invitrogen) por operación centrífuga (1,000 rpm, 3 minutos). Las células así obtenidas se resuspendieron en HBSS a razón de 1×10^7 células/ml.

Ratones lampiños (BALB/cAJcl-nu/nu) (5 semanas, hembras), comprados en CLEA Japón, Inc., se sometieron a una laparotomía bajo anestesia etérea para exponer el bazo. La suspensión de células OV-90 descrita anteriormente se inoculó en el bazo a razón de 100 μl por animal. Después de la inoculación celular, se inyectó por vía intravenosa al animal en la vena de la cola con 3 mg/ml de la dilución de Nec8-4116-8 en PBS para alcanzar 30 mg/kg cada semana y se observó después del día 14 cuando se implanta en el hígado (en los días 14, 21, 28, 35 y 42). Para el grupo de control, se administró solución salina fisiológica. Una semana después de la administración final, se administró 1 ml de azul de Evans al 2.5% por la vena de la cola, se sacó el hígado y se sumergió en una solución neutra de formol al 10% regulada para fijación. Luego, se observó visualmente el crecimiento de las células cancerosas metastatizadas del hígado.

Como resultado, se advirtió que el crecimiento del tumor en el hígado en 6 de cada 6 casos del grupo de control, mientras que en el grupo Nec8-4116-8, se advirtió el crecimiento del tumor en el hígado sólo en uno de cada 6 casos, lo que indica que Nec8-4116-8 suprimió en forma marcada el crecimiento de las células cancerosas implantadas en el hígado.

627.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal humano.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal quimérico.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal humanizado.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal perteneciente a la subclase de la IgG_1 humana.

7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual tiene actividad inhibidora del crecimiento de células cancerosas.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual presenta citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual tiene actividad inhibidora de la unión trans de nectina-2/nectina-3 o de nectina-2/nectina-2.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el epítope presente en las secuencias de aminoácidos 1 a 350 representadas por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual

628.

es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el epítope presente en las secuencias de aminoácidos 47 a 142 o 175 a 240 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3.

12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la secuencia de aminoácidos que contiene por lo menos uno de los residuos de los aminoácidos 75, 76, 77, 78, 95, 137, 145, 173, 184, 186 y 212 de las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3.

13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula del hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1(FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1(FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), a la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es capaz de reconocer la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo monoclonal producido por la célula del hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427) o Nec1-834-1 (FERM BP-10428),

Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

15. Una célula de hibridoma, la cual es capaz de producir el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.

16. La célula de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 15, la cual está representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

17. Un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 16.

18. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal recombinante.

19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) el número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) el número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) el número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ

630.

ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente.

20. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) el número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) el número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) el número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente.

21. Un agente de diagnóstico, el cual comprende un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

22. El agente de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 21, el cual es un agente de diagnóstico para el cáncer.

23. Un medicamento, el cual comprende un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

24. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 23, el cual es un agente para prevenir/tratar el cáncer.

631

25. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 23, el cual es un inductor de apoptosis de células cancerosas.

26. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 23, el cual es un inhibidor del crecimiento de células cancerosas.

27. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 23, el cual es un agente citotóxico contra células cancerosas, en donde se usa un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo.

28. Un método para prevenir/tratar el cáncer, el cual comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

29. Un método para inducir la apoptosis de células cancerosas, el cual comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo.

30. Un método para inhibir el crecimiento de células cancerosas, el cual comprende la administración a un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo.

31. Un método de destrucción de células cancerosas a través de un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo, el cual comprende la administración a

~~631~~
632

un mamífero de una dosis efectiva de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo.

32. El uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo, en la fabricación de un agente para prevenir/tratar el cáncer.

33. El uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo, en la fabricación de un inductor de apoptosis de células cancerosas.

34. El uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo, en la fabricación de un inhibidor del crecimiento de células cancerosas.

35. El uso de un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial, o una sal del mismo, en la fabricación de un agente citotóxico contra células cancerosas a través de un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc de un anticuerpo.

36. Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el

~~632~~
633

cual comprende un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

37. Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el cual comprende un anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

38. El agente para prevenir o tratar el cáncer de mama de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec1-554-1 (FERM BP-10681) es Nec1-1044-4 (FERM BP-10805) o Nec1-1302-2 (FERM BP-10684).

39. El agente para prevenir o tratar el cáncer de mama de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el anticuerpo monoclonal que se une a la nectina-2 en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma representada por Nec8-4116-8 (FERM BP-10685) es Nec8-3704-7 (FERM BP-10807) o Nec8-3517-11 (FERM BP-10806).

40. El agente para prevenir o tratar el cáncer de mama de

633

acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, en donde se utiliza un mecanismo de defensa del huésped mediado por la región Fc del anticuerpo.

41. Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el cual comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo, comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente.

42. Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el cual comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo, que son la secuencia de aminoácidos representadas por (iv) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y

305, y (vi) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente.

43. Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el cual comprende un anticuerpo en el cual las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (i) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280 y 296, (ii) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281 y 297, y (iii) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282 y 298, respectivamente; en donde las secuencias de aminoácidos de la primera región determinante de complementariedad (CDR1), la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) y la tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de una región variable de cadena liviana de dicho anticuerpo, comprenden la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por (iv) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 y 304, (v) un número de identificación de secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 305, y (vi) un número de identificación de

635.

secuencia seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 306, respectivamente; y una región constante de dicho anticuerpo.

44. Una célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807).

45. Un anticuerpo monoclonal producido por la célula de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 44.

46. Un anticuerpo monoclonal que se une en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido a partir de la célula de hibridoma representada por Nec1-1044-4 (FERM BP-10805), Nec8-3517-11 (FERM BP-10806) o Nec8-3704-7 (FERM BP-10807).

47. Un agente para prevenir o tratar el cáncer de mama, el cual comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 45 o 46.

636.

RESUMEN

Se da a conocer un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma o sustancialmente la misma que la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO: 1 ó 3, un péptido parcial de la proteína, o una sal de la proteína. El anticuerpo monoclonal humano es útil como un agente profiláctico o terapéutico para el cáncer, un promotor de la apoptosis de las células de cáncer, un inhibidor de la proliferación de las células de cáncer, un agente citotóxico para una célula de cáncer que utiliza un mecanismo de biodefensa por medio de una región Tc de un anticuerpo, o similares.

* * * * *

Cadena Pesada



Cadena Liviana

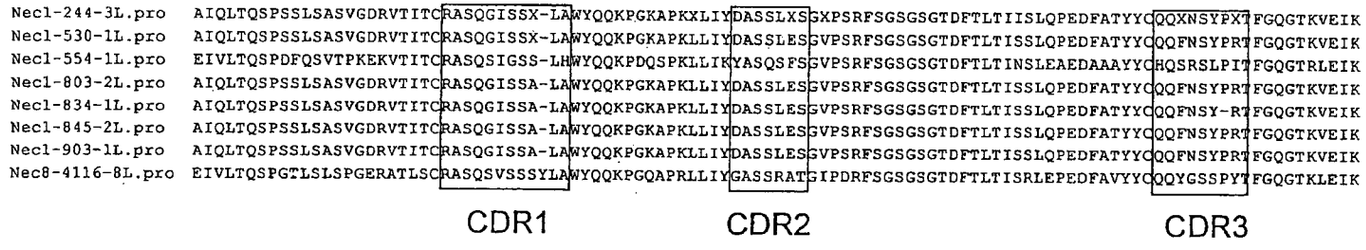


FIG. 1

Cadena Pesada

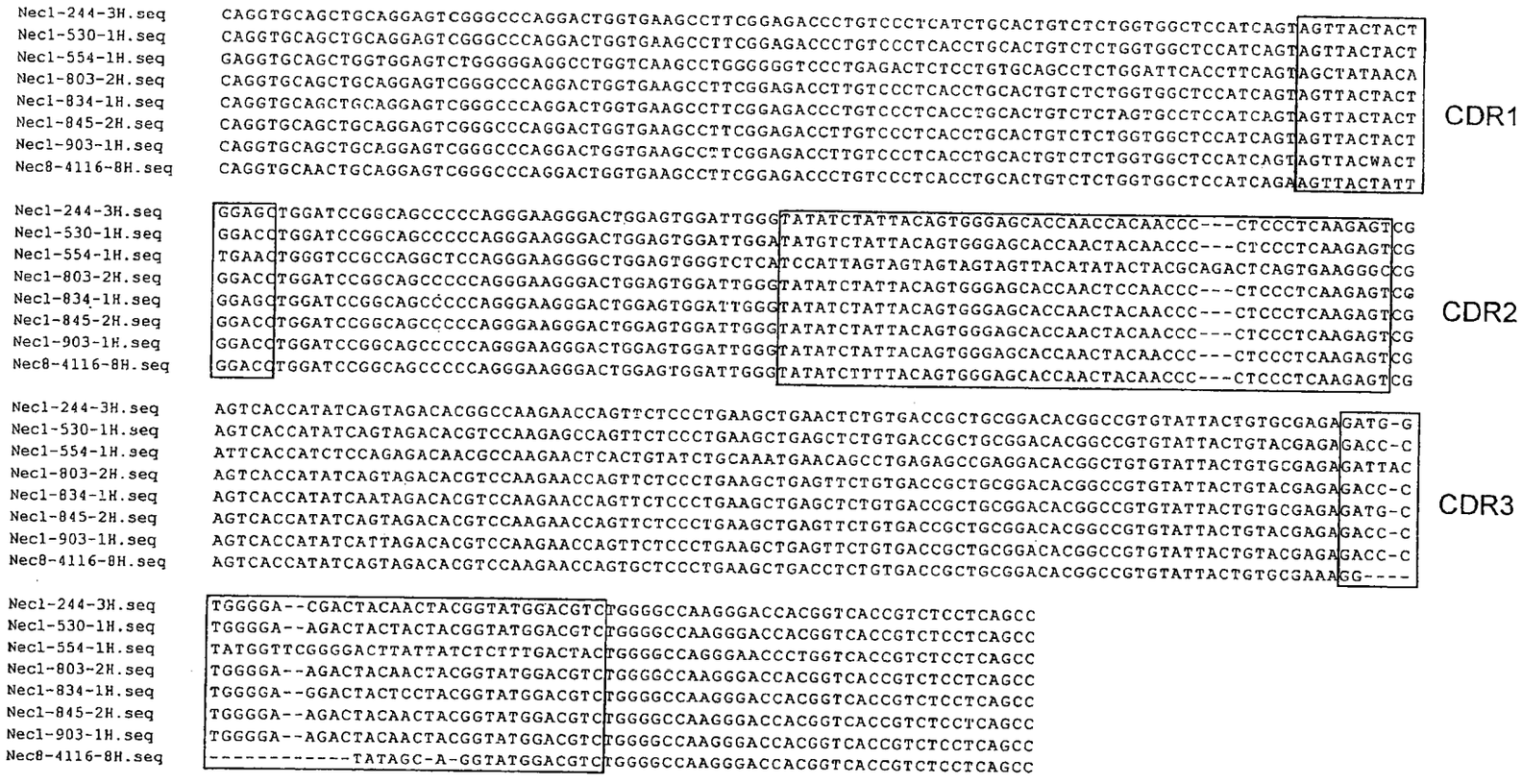


FIG. 2

Cadena Liviana

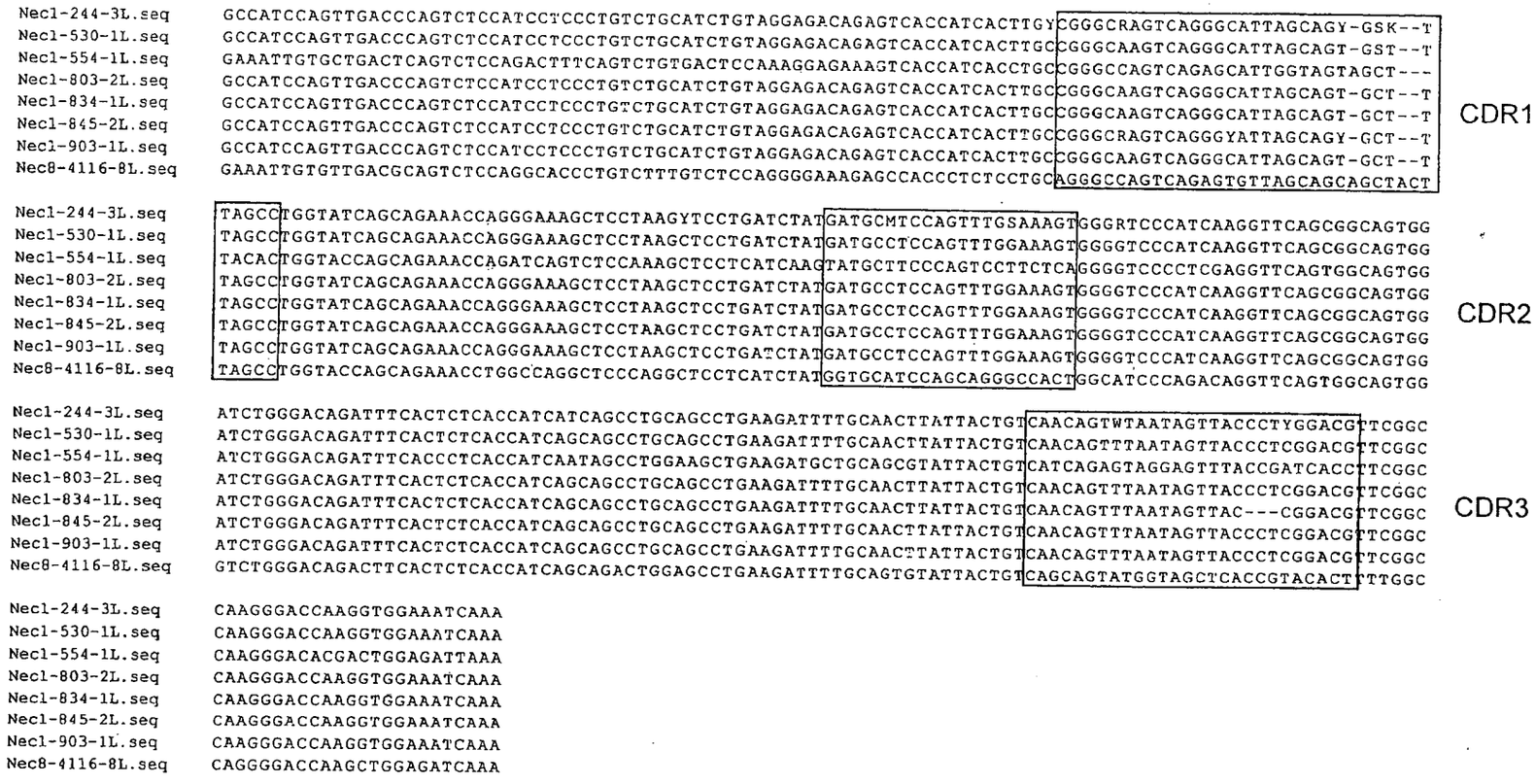


FIG. 3

699

640

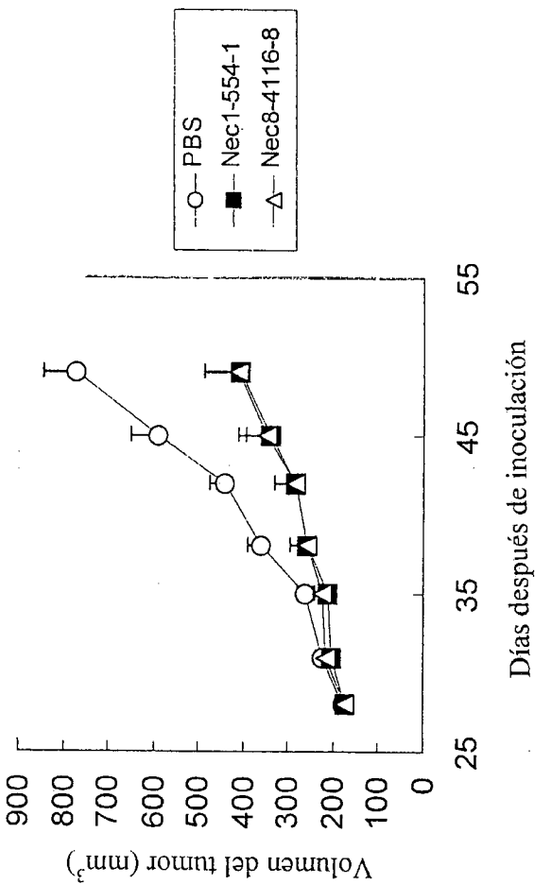

PBS
Nec1-554-1
Nec8-4116-8
Volumen del tumor (mm³)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
25
35
45
55
Días después de inoculación

FIG. 4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Agente para prevenir/tartar cáncer

<130> G07-0129

<150> PCT/JP2006/320429

<151> 2006-10-06

<150> JP2007-100876

<151> 2007-04-06

<160> 317

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 479

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
                85                  90                  95
Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
            100                 105                 110
Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
```

115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr

130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala

145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp

165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala

180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln

195 200 205

Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr

210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val

225 230 235 240

Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser

245 250 255

Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp

260 265 270

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn

275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro

290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp

305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly

325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Arg Ala

340 345 350

Ser Pro Arg Asp Val Gly Pro Leu Val Trp Gly Ala Val Gly Gly Thr

355 360 365

Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Ile Leu

370 375 380

Leu Arg Val Arg Arg Arg Arg Lys Ser Pro Gly Gly Ala Gly Gly Gly

385 390 395 400

Ala Ser Gly Asp Gly Gly Phe Tyr Asp Pro Lys Ala Gln Val Leu Gly

405 410 415

Asn Gly Asp Pro Val Phe Trp Thr Pro Val Val Pro Gly Pro Met Glu

420 425 430

Pro Asp Gly Lys Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ala Glu

435 440 445

Lys Gly Leu Met Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Glu Asp Asp Met Glu

450 455 460

Ser Gln Leu Asp Gly Ser Leu Ile Ser Arg Arg Ala Val Tyr Val

465 470 475

<210> 2

<211> 1437

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatctccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300

gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540

gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660

agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agaaaccccc agggcctcgc cccgagatgt gggcccgctg 1080

gtgtgggggg ccgtgggggg gacactgctg gtgctgctgc ttctggctgg ggggtccttg 1140

gccttcatcc tgctgagggt gaggaggagg aggaagagcc ctggaggagc aggaggagga 1200

gccagtggcg acgggggatt ctacgatccg aaagctcagg tgttgggaaa tggggacccc 1260

gtcttctgga caccagtagt ccctggtccc atggaaccag atggcaagga tgaggaggag 1320

gaggaggagg aagagaaggc agagaaaggc ctcatgttgc ctccaccccc agcactcgag 1380

gatgacatgg agtcccagct ggacggctcc ctcatctcac ggcgggcagt ttatgtg 1437

<210> 3

<211> 538

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro

1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln

20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly

35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr

50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln

65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro

85 90 95

Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr

100 105 110

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
195 200 205

Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225 230 235 240

Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
245 250 255

Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
260 265 270

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
340 345 350

Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala
355 360 365

Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
370 375 380

Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
385 390 395 400

Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
405 410 415

Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
420 425 430

Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
435 440 445

Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
450 455 460

Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
465 470 475 480

Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp
485 490 495

Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile
500 505 510

Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys
515 520 525

Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
530 535

<210> 4

<211> 1614

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300

gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540

gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660

agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacaggcggc 1080

atcatcgggg gcatcatcgc cgccatcatt gctactgctg tggctgccac gggcatcctt 1140

atctgccggc agcagcggaa ggagcagacg ctgcaggggg cagaggagga cgaagacctg 1200

gagggacctc cctcctacaa gccaccgacc ccaaaagcga agctggaggc acaggagatg 1260

ccctcccagc tcttcactct gggggcctcg gagcacagcc cactcaagac cccctacttt 1320

gatgctggcg cctcatgcac tgagcaggaa atgcctcgat accatgagct gcccaccttg 1380

gaagaacggt caggaccctt gcaccctgga gccacaagcc tggggtcccc catcccggtg 1440

cctccagggc cacctgctgt ggaagacgtt tccctggatc tagaggatga ggaggggggag 1500

gaggaggaag agtatctgga caagatcaac cccatctatg atgctctgtc ctatagcagc 1560

ccctctgatt cctaccaggg caaaggcttt gtcatgtccc gggccatgta tgtg 1614

<210> 5

<211> 549

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Ala Gln Leu Ser Ser Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Gln
20 25 30

Pro Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Leu Leu
35 40 45

Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Pro Ile Ile Val Glu Pro
50 55 60

His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80

Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95

Lys Ser Ser Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110

Val Gln Gly Glu Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140

Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160

Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
165 170 175

Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Ile
180 185 190

Cys Ile Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala His Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205

Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Thr Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220

Ala Thr Ile Ile Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240

Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
275 280 285

Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300

Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320

Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Phe Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 330 335

Ile Cys Lys Val Thr Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
340 345 350

Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ile
355 360 365

Gln Trp His Pro Ser Thr Ala Asp Ile Glu Asp Leu Ala Thr Glu Pro
370 375 380

Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Lys Asp Asp
385 390 395 400

Thr Ile Ala Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Ile
405 410 415

Val Leu Val Ser Val Leu Ala Gly Ile Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg
420 425 430

Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp
435 440 445

Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu Gln Gln Asp Glu Leu Asp
450 455 460

Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn
465 470 475 480
Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn
485 490 495
Asn Val Glu Asn Leu Asn Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu
500 505 510
Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu His Tyr Asp Glu
515 520 525
Asn Glu Asp Asp Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg
530 535 540
Arg Glu Trp Tyr Val
545

<210> 6
<211> 1647
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 6

atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc 60
tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg 120
ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt 180
attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt 240
gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag 300
actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga 360
gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc 420
tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc 480
tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct 540
ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc 600
gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt 660
ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga 720
ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct 780

650.

ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg 840

tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc 900

aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat 960

actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg 1020

accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact 1080

actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta 1140

gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac 1200

acaattgcca cgatcattgc tagtgtagtg ggtggggctc tcttcatagt acttgtaagt 1260

gttttggctg gaatattctg ctataggaga agacggacgt ttcgtggaga ctactttgcc 1320

aagaactaca ttccaccatc agatatgcaa aaagaatcac aaatagatgt tcttcaacaa 1380

gatgagcttg attcttaccc agacagtgta aaaaaagaaa acaaaaatcc agtgaacaat 1440

ctaatacgta aagactattt agaagagcct gaaaaaactc agtggaacaa tgtagaaaat 1500

ctcaataggt ttgaaagacc aatggattat tatgaagatc taaaaatggg aatgaagttt 1560

gtcagtgatg aacattatga tgaaaacgaa gatgacttag tttcacatgt agatggttcc 1620

gtaatttcca ggagggagtg gtatgtt 1647

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleotido anti-sentido 1

<400> 7

tcccaacacc tgagctttcg 20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleotido de Control 1

<400> 8

gctttcgagt ccacaaccct 20

651

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9

ggtcatcttt gtccgagaaa cc 22

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 10

tgagctttcg gatcgtagaa tc 22

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TaqMan Sonda 1

<400> 11

ccgagatgtg ggcccgct 18

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 12

652.

cccactcaag acccccctact tt 22

<210> 13

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 13

gctcatggta tcgaggcatt tc 22

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TaqMan Sonda 2

<400> 14

atgctggcgc ctcatgcact gag 23

<210> 15

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 15

aattgaattc atggcccggg ccgct 25

<210> 16

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 16

aattgatatc tcacacataa actgcccgcc gt 32

<210> 17

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 17

gatatctcac acatacatgg cccgggaca 29

<210> 18

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 18

attgatatct cacacataca tggcccggga catg 34

<210> 19

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-1

<400> 19

acuacacuug cgaguuugc 19

<210> 20

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

654.

<223> siARN-1

<400> 20

gcaaacucgc aaguguagu 19

<210> 21

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-2

<400> 21

aaaguggagc augagagcu 19

<210> 22

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-2

<400> 22

agcucucaug cuccacuuu 19

<210> 23

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-3

<400> 23

ggucaucuuu guccgagaa 19

<210> 24

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-3

<400> 24

uucucggaca aagaugacc 19

<210> 25

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-4

<400> 25

gauucuacga uccgaaagc 19

<210> 26

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-4

<400> 26

gcuuucggau cguagaauc 19

<210> 27

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-5

<400> 27

ggaagagaag gcagagaaa 19

<210> 28

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> siARN-5

<400> 28

uuucucugcc uucucuucc 19

<210> 29

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 29

aattgaattc atggcccggg ccgct 25

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 30

aattctcgag ggcccctgcg cctgctgtgt 30

<210> 31

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro

5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln

```
                20                  25                  30
Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
            35                  40                  45
Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
        50                  55                  60
Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
65                  70                  75                  80
Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
                85                  90                  95
Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
            100                 105                 110
Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
        115                 120                 125
Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
    130                 135                 140
Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145                 150                 155                 160
Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
                165                 170                 175
Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
            180                 185                 190
Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
    210                 215                 220
Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225                 230                 235                 240
Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
                245                 250                 255
Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
            260                 265                 270
```

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
340 345 350

Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Leu Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
355 360 365

Asp Asp Lys
370

<210> 32

<211> 1113

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 32

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300

gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540

gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660

agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacaggcggc 1080

atcctcgagg attacaagga tgacgacgat aag 1113

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 33

aattgaattc cccaaatctt gtgacaaaac 30

<210> 34

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 34

aattctcgag tcatttaccc ggagacagg 29

<210> 35

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 35

aattaagctt atggcccggg ccgct 25

<210> 36

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 36

aattgaattc gggggtttct cgga 24

<210> 37

<211> 583

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
85 90 95

Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
100 105 110

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
115 120 125

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

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
325 330 335
Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Glu Phe
340 345 350
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
355 360 365

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
370 375 380
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
385 390 395 400
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
405 410 415
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
420 425 430
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
435 440 445
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
450 455 460
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465 470 475 480
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
485 490 495
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 38

<211> 1749

<212> ADN

6 f 3.

<213> Homo sapiens

<400> 38

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300

gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540

gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660

agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc gaattcccca aatcttgtga caaaactcac 1080

acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 1140

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 1200

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1260

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1320

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1380

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1440

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1500

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1560

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1620

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1680

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1740

ccgggtaaa 1749

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido 1 usado en el Ejemplo 16

<400> 39

Cys Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro Lys Pro Gly Ser Glu
5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido 2 usado en el Ejemplo 16

<400> 40

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

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido 3 usado en el Ejemplo 16

<400> 41

Cys Thr Leu Gly Ala Ser Glu His Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr
5 10 15

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 42

gcccactcaa gacccccctac 20

<210> 43

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 43

tcgaggcatt tcctgctca 19

<210> 44

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 44

ttgatgctgg cgcctcatgc a 21

<210> 45

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 45

aattgaattc cccagagggc ccacaatc 28

<210> 46

<211> 27

676.

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 46

aattctcgag tcatttaccc ggagtcc 27

<210> 47

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 47

agttaagctt atggcgcgga ccctgcggc 29

<210> 48

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 48

attgaattcc gtggcaattg tgtcat 26

<210> 49

<211> 637

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ala Arg Thr Leu Arg Pro Ser Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
5 10 15

Ala Gln Leu Ser Ser Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Gln

20 25 30

Pro Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Leu Leu

35 40 45

Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Pro Ile Ile Val Glu Pro

50 55 60

His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile

65 70 75 80

Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly

85 90 95

Lys Ser Ser Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser

100 105 110

Val Gln Gly Glu Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu

115 120 125

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly

130 135 140

Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser

145 150 155 160

Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys

165 170 175

Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Ile

180 185 190

Cys Ile Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala His Ile Asp Trp Glu Gly

195 200 205

Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Thr Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr

210 215 220

Ala Thr Ile Ile Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg

225 230 235 240

Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp

245 250 255

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser

260 265 270

Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn

275 280 285

Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp

290 295 300

Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn

305 310 315 320

Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Phe Asn Tyr Ser Gly Val Tyr

325 330 335

Ile Cys Lys Val Thr Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val

340 345 350

Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ile

355 360 365

Gln Trp His Pro Ser Thr Ala Asp Ile Glu Asp Leu Ala Thr Glu Pro

370 375 380

Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Lys Asp Asp

385 390 395 400

Thr Ile Ala Thr Glu Phe Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

405 410 415

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

420 425 430

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

435 440 445

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

450 455 460

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

465 470 475 480

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

485 490 495

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

500 505 510

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

515 520 525

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

530 535 540

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

545 550 555 560

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

565 570 575

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

580 585 590

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

595 600 605

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

610 615 620

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

625 630 635

<210> 50

<211> 1911

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 50

atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc 60

tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg 120

ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt 180

attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt 240

gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag 300

actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga 360

gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc 420

tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc 480

tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct 540

ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc 600

gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt 660

ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga 720

ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct 780

ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg 840

tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc 900

aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat 960

actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg 1020

accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact 1080

actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta 1140

gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac 1200

acaattgcca cggaattccc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 1260

gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 1320

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1380

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1440

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1500

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1560

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1620

ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1680

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1740

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1800

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1860

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1911

<210> 51

<211> 638

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Ala Arg Thr Leu Arg Pro Ser Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys

5 10 15

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

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140
Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
165 170 175
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Ile
180 185 190
Cys Ile Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala His Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Thr Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220
Ala Thr Ile Ile Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
275 280 285

Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300

Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320

Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Phe Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 330 335

Ile Cys Lys Val Thr Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
340 345 350

Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ile
355 360 365

Gln Trp His Pro Ser Thr Ala Asp Ile Glu Asp Leu Ala Thr Glu Pro
370 375 380

Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Lys Asp Asp
385 390 395 400

Thr Ile Ala Thr Glu Phe Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
405 410 415

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
420 425 430

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val
450 455 460

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
465 470 475 480

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala
485 490 495

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
500 505 510

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
515 520 525

Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
530 535 540

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
545 550 555 560

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
565 570 575

Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
580 585 590

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
595 600 605

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
610 615 620

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
625 630 635

<210> 52

<211> 1914

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc 60

tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg 120

ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt 180

attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt 240

gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag 300

actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga 360

gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc 420

tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc 480

684.

tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct 540

ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc 600

gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt 660

ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga 720

ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct 780

ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg 840

tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc 900

aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat 960

actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg 1020

accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact 1080

actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta 1140

gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac 1200

acaattgcca cggaattccc cagagggccc acaatcaagc cctgtcctcc atgcaaatgc 1260

ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat 1320

gtactcatga tctccctgag ccccatagtc acatgtgtgg tggtggatgt gagcgaggat 1380

gacccagatg tccagatcag ctggtttgtg aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca 1440

caaacccata gagaggatta caacagtact ctccgggtgg tcagtgccct ccccatccag 1500

caccaggact ggatgagtgg caaggagttc aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca 1560

gcgcccatcg agagaaccat ctcaaaaccc aaagggtcag taagagctcc acaggtatat 1620

gtcttgcctc caccagaaga agagatgact aagaaacagg tcactctgac ctgcatggtc 1680

acagacttca tgcctgaaga catttacgtg gagtggacca acaacgggaa aacagagcta 1740

aactacaaga acactgaacc agtcctggac tctgatggtt cttacttcat gtacagcaag 1800

ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa agaaatagct actcctgttc agtggtccac 1860

gagggtctgc acaatcacca cacgactaag agcttctccc ggactccggg taaa 1914

<210> 53

<211> 102

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica proteína flag

<400> 53

ctagtctcga gaattcacgc gtggtacctc tagagtcgac atggactaca aggacgacga 60

tgacaaggct agcgactaca aggacgacga tgacaagtga gc 102

<210> 54

<211> 101

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica proteína flag

<400> 54

ggccgctcac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgctagcc ttgtcatcgt cgtccttgta 60

gtccatgtcg actctagagg taccacgcgt aattctcgag a 101

<210> 55

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 55

acgcgtcgac caccatggcg cggaccctgc ggcc 34

<210> 56

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 56

ctagctagcc gtggcaattg tgtcatcct 29

<210> 57

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Nectina-3ED-proteína FLAG

<400> 57

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

Ala Gln Leu Ser Ser Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Gln
20 25 30

Pro Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Leu Leu
35 40 45

Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Pro Ile Ile Val Glu Pro
50 55 60

His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80

Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
85 90 95

Lys Ser Ser Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
100 105 110

Val Gln Gly Glu Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125

Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140

Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160

Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
165 170 175

Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Ile
180 185 190

Cys Ile Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala His Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205

Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Thr Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr

210 215 220

Ala Thr Ile Ile Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
225 230 235 240

Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
245 250 255

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
260 265 270

Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
275 280 285

Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
290 295 300

Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
305 310 315 320

Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Phe Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
325 330 335

Ile Cys Lys Val Thr Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
340 345 350

Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ile
355 360 365

Gln Trp His Pro Ser Thr Ala Asp Ile Glu Asp Leu Ala Thr Glu Pro
370 375 380

Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Ile Lys Asp Asp
385 390 395 400

Thr Ile Ala Thr Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
405 410

<210> 58

<211> 1242

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica Nectina-3ED-proteína FLAG

<400> 58

atggcgcgga ccctgcggcc gtccccgctg tgtcctggag gcggcaaagc acaactttcc 60

tccgcttctc tcctcggagc cgggctcctg ctgcagcccc cgacgccacc tccgctgctg 120

ctgctgctct tcccgctgct gctcttctcc aggctctgtg gtgccttagc tggaccaatt 180

attgtggagc cacatgtcac agcagtatgg ggaaagaatg tttcattaaa gtgtttaatt 240

gaagtaaatg aaaccataac acagatttca tgggagaaga tacatggcaa aagttcacag 300

actgttgcag ttcaccatcc ccaatatgga ttctctgttc aaggagaata tcagggaaga 360

gtcttgttta aaaattactc acttaatgat gcaacaatta ctctgcataa cataggattc 420

tctgattctg gaaaatacat ctgcaaagct gttacattcc cgcttggaaa tgcccagtcc 480

tctacaactg taactgtgtt agttgaaccc actgtgagcc tgataaaagg gccagattct 540

ttaattgatg gaggaaatga aacagtagca gccatttgca tcgcagccac tggaaaaccc 600

gttgcacata ttgactggga aggtgatctt ggtgaaatgg aatccactac aacttctttt 660

ccaaatgaaa cggcaacgat tatcagccag tacaagctat ttccaaccag atttgctaga 720

ggaaggcgaa ttacttgtgt tgtaaaacat ccagccttgg aaaaggacat ccgatactct 780

ttcatattag acatacagta tgctcctgaa gtttcggtaa caggatatga tggaaattgg 840

tttgtaggaa gaaaaggtgt taatctcaaa tgtaatgctg atgcaaatcc accacccttc 900

aaatctgtgt ggagcaggtt ggatggacaa tggcctgatg gtttattggc ttcagacaat 960

actcttcatt ttgtccatcc attgactttc aattattctg gtgtttatat ctgtaaagtg 1020

accaattccc ttggtcaaag aagtgaccaa aaagtcatct acatttcaga tcctcctact 1080

actaccaccc ttcagcctac aattcagtgg catccctcaa ctgctgacat cgaggatcta 1140

gcaacagaac ctaaaaaatt gcccttccca ttgtcaactt tggcaacaat taaggatgac 1200

acaattgcca cggctagcga ctacaaggac gacgatgaca ag 1242

<210> 59

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 59

aattgatatc atggctcgga tggggctt 28

<210> 60

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 60

aattctcgag cacgtaccac tccttctt 28

<210> 61

<211> 1551

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 61

atggctcgga tggggcttgc gggcgccgct ggacgctggt ggggactcgc tctcggcttg 60

accgcattct tcctcccagg cgtccactcc caggtggtcc aggtgaacga ctccatgtat 120

ggcttcatcg gcacagacgt ggttctgcac tgcagctttg ccaacccgct tcccagcgtg 180

aagatcaccc aggtcacatg gcagaagtcc accaatggct ccaagcagaa cgtggccatc 240

tacaacccat ccatgggcgt gtccgtgctg gctccctacc gcgagcgtgt ggaattcctg 300

cggccctcct tcaccgatgg cactatccgc ctctcccgcc tggagctgga ggatgagggt 360

gtctacatct gcgagtttgc taccttccct acgggcaatc gagaaagcca gctcaatctc 420

acggtgatgg ccaaacccac caattggata gagggtaccc aggcagtgct tcgagccaag 480

aaggggcagg atgacaaggt cctggtggcc acctgcacct cagccaatgg gaagcctccc 540

agtgtggtat cctgggaaac tcggttaaaa ggtgaggcag agtaccagga gatccggaac 600

cccaatggca cagtgacggt catcagccgc taccgcctgg tgcccagcag ggaagcccac 660

cagcagtcct tggcctgcat cgtcaactac cacatggacc gcttcaagga aagcctcact 720

ctcaacgtgc agtatgagcc tgaggtaacc attgaggggt ttgatggcaa ctggtacctg 780

cagcggatgg acgtgaagct cacctgcaaa gctgatgcta acccccccagc cactgagtac 840

cactggacca cgctaaatgg ctctctcccc aagggtgtgg aggcccagaa cagaaccctc 900

ttcttcaagg gacccatcaa ctacagcctg gcagggacct acatctgtga ggccaccaac 960

cccatcggta cacgctcagg ccaggtggag gtcaatatca cagaattccc ctacaccccg 1020

tctcctcccg aacatgggcg gcgcgccggg ccggtgccca cggccatcat tgggggcgtg 1080

gcggggagca tcctgctggt gttgattgtg gtcggcggga tcgtggtcgc cctgcgtcgg 1140

cgccggcaca ccttcaaggg tgactacagc accaagaagc acgtgtatgg caacggctac 1200

agcaaggcag gcatccccca gcaccaccca ccaatggcac agaacctgca gtaccccgac 1260

gactcagacg acgagaagaa ggccggccca ctgggtggaa gcagctatga ggaggaggag 1320

gaggaggagg agggcggtgg agggggcgag cgcaaggtgg gcggccccca ccccaaatat 1380

gacgaggacg ccaagcggcc ctacttcacc gtggatgagg ccgaggcccg tcaggacggc 1440

tacggggacc ggactctggg ctaccagtac gaccctgagc agctggactt ggctgagaac 1500

atggtttctc agaacgacgg gtctttcatt tccaagaagg agtggtacgt g 1551

<210> 62

<211> 517

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Val His Ser Gln Val
20 25 30

Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
35 40 45

Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Ser Val Lys Ile Thr Gln
50 55 60

Val Thr Trp Gln Lys Ser Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ser Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
85 90 95

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

Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
115 120 125

Phe Pro Thr Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Ala
130 135 140

Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Ala Lys
145 150 155 160
Lys Gly Gln Asp Asp Lys Val Leu Val Ala Thr Cys Thr Ser Ala Asn
165 170 175

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

Phe Lys Gly Asp Tyr Ser Thr Lys Lys His Val Tyr Gly Asn Gly Tyr
385 390 395 400
Ser Lys Ala Gly Ile Pro Gln His His Pro Pro Met Ala Gln Asn Leu
405 410 415
Gln Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Asp Glu Lys Lys Ala Gly Pro Leu Gly
420 425 430
Gly Ser Ser Tyr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Glu Arg Lys Val Gly Gly Pro His Pro Lys Tyr Asp Glu Asp Ala
450 455 460
Lys Arg Pro Tyr Phe Thr Val Asp Glu Ala Glu Ala Arg Gln Asp Gly
465 470 475 480
Tyr Gly Asp Arg Thr Leu Gly Tyr Gln Tyr Asp Pro Glu Gln Leu Asp
485 490 495
Leu Ala Glu Asn Met Val Ser Gln Asn Asp Gly Ser Phe Ile Ser Lys
500 505 510
Lys Glu Trp Tyr Val
515

<210> 63
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 63
atcgatatct caaacatacc actccctcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

<223> Cebador

<400> 64

aattctcgag aacataccac tccctcctg 29

<210> 65

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 65

aattgaattc atgcccctgt ccctg 25

<210> 66

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 66

ttaactcgag gaccaggtgt ccccgccca 29

<210> 67

<211> 1530

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 67

atgcccctgt ccctgggagc cgagatgtgg gggcctgagg cctggctgct gctgctgcta 60

ctgctggcat catttacagg ccggtgcccc gcgggtgagc tggagacctc agacgtggta 120

actgtggtgc tgggccagga cgcaaaactg ccctgcttct accgagggga ctccggcgag 180

caagtggggc aagtggcatg ggctcgggtg gacgcgggcg aaggcgccca ggaactagcg 240

ctactgcact ccaaatacgg gcttcatgtg agcccggctt acgagggccg cgtggagcag 300

ccgccgcccc cacgcaaccc cctggacggc tcagtgctcc tgcgcaacgc agtgcaggcg 360

gatgagggcg agtacgagtg ccgggtcagc accttccccg ccggcagctt ccaggcgcgg 420

ctgcggctcc gagtgctggt gcctcccctg ccctcactga atcctggtcc agcactagaa 480

gagggccagg gcctgaccct ggcagcctcc tgcacagctg agggcagccc agcccccagc 540

gtgacctggg acacggaggt caaaggcaca acgtccagcc gttccttcaa gcactcccgc 600

tctgctgccg tcacctcaga gttccacttg gtgcctagcc gcagcatgaa tgggcagcca 660

ctgacttgtg tggtgtccca tcctggcctg ctccaggacc aaaggatcac ccacatcctc 720

cacgtgtcct tccttgctga ggcctctgtg aggggccttg aagaccaaaa tctgtggcac 780

attggcagag aaggagctat gctcaagtgc ctgagtgaag ggcagccccc tccctcatac 840

aactggacac ggctggatgg gcctctgccc agtggggtac gagtggatgg ggacactttg 900

ggctttcccc cactgaccac tgagcacagc ggcatctacg tctgccatgt cagcaatgag 960

ttctcctcaa gggattctca ggtcactgtg gatgttcttg acccccagga agactctggg 1020

aagcaggtgg acctagtgtc agcctcggtg gtggtggtgg gtgtgatcgc cgcactcttg 1080

ttctgccttc tggtggtggt ggtggtgctc atgtcccgat accatcggcg caaggcccag 1140

cagatgaccc agaaatatga ggaggagctg accctgacca gggagaactc catccggagg 1200

ctgcattccc atcacacgga ccccaggagc cagccggagg agagtgtagg gctgagagcc 1260

gagggccacc ctgatagtct caaggacaac agtagctgct ctgtgatgag tgaagagccc 1320

gagggccgca gttactccac gctgaccacg gtgagggaga tagaaacaca gactgaactg 1380

ctgtctccag gctctgggcg ggccgaggag gaggaagatc aggatgaagg catcaaacag 1440

gccatgaacc attttgttca ggagaatggg accctacggg ccaagcccac gggcaatggc 1500

atctacatca atgggcgggg acacctggtc 1530

<210> 68

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly

20 25 30

Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala

35 40 45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln

50 55 60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala

65 70 75 80

Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly

85 90 95

Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val

100 105 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg

115 120 125

Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg

130 135 140

Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu

145 150 155 160

Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser

165 170 175

Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr Thr Ser

180 185 190

Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser Glu Phe

195 200 205

His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr Cys Val

210 215 220

Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His Ile Leu

225 230 235 240

His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu Asp Gln

245 250 255

Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys Leu Ser

260 265 270

Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp Gly Pro

275 280 285

Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp Thr Leu Gly Phe Pro Pro
290 295 300

Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser Asn Glu
305 310 315 320

Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp Pro Gln
325 330 335

Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Val
340 345 350

Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val
355 360 365

Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys Ala Gln Gln Met Thr Gln
370 375 380

Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg Glu Asn Ser Ile Arg Arg
385 390 395 400

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

Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser Leu Lys Asp Asn Ser Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Thr Leu
435 440 445

Thr Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr Glu Leu Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln Asp Glu Gly Ile Lys Gln
465 470 475 480

Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly Thr Leu Arg Ala Lys Pro
485 490 495

Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Gly His Leu Val
500 505 510

<210> 69

<211> 25

<212> ADN

697

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 69

aattaagctt atggcccgag ccatg 25

<210> 70

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 70

aattgtcgac ccttgtgccc tctgt 25

<210> 71

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
20 25 30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
35 40 45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
50 55 60

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
65 70 75 80

Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
85 90 95

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

340 345 350

Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser

355 360 365

Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser

370 375 380

Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala

385 390 395 400

Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr

405 410 415

Arg

<210> 72

<211> 1251

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 72

atggcccgag ccatggccgc cgcgtggccg ctgctgctgg tggcgctact ggtgctgtcc 60

tggccacccc caggaaccgg ggacgtcgtc gtgcaggcgc ccacccaggt gcccggcttc 120

ttgggcgact ccgtgacgct gccctgctac ctacaggtgc ccaacatgga ggtgacgcat 180

gtgtcacagc tgacttgggc gcggcatggt gaatctggca gcatggccgt cttccaccaa 240

acgcagggcc ccagctattc ggagtccaaa cggctggaat tcgtggcagc cagactgggc 300

gcggagctgc ggaatgcctc gctgaggatg ttcgggttgc gcgtagagga tgaaggcaac 360

tacacctgcc tgttcgtcac gttcccgcag ggcagcagga gcgtggatat ctggctccga 420

gtgcttgcca agccccagaa cacagctgag gttcagaagg tccagctcac tggagagcca 480

gtgcccatgg cccgctgcgt ctccacaggg ggtcgcccgc cagcccaaat cacctggcac 540

tcagacctgg gcgggatgcc caatacgagc caggtgccag ggttcctgtc tggcacagtc 600

actgtcacca gcctctggat attggtgccc tcaagccagg tggacggcaa gaatgtgacc 660

tgcaaggtgg agcacgagag ctttgagaag cctcagctgc tgactgtgaa cctcaccgtg 720

tactaccccc cagaggtatc catctctggc tatgataaca actggtacct tggccagaat 780

gaggccaccc tgacctgcga tgctcgcagc aacccagagc ccacaggcta taattggagc 840

acgaccatgg gtcccctgcc acccttttgct gtggcccagg gcgcccagct cctgatccgt 900

cctgtggaca aaccaatcaa cacaacttta atctgcaacg tcaccaatgc cctaggagct 960

cgccaggcag aactgaccgt ccaggtcaaa gagggacctc ccagtgagca ctcaggcatg 1020

tcccgtaacg ccatcatctt cctggttctg ggaatcctgg tttttctgat cctgctgggg 1080

atcgggattt atttctattg gtccaaatgt tcccgtgagg tcctttggca ctgtcatctg 1140

tgtccctcga gtacagagca tgccagcgcc tcagctaatg ggcatgtctc ctattcagct 1200

gtgagcagag agaacagctc ttcccaggat ccacagacag agggcacaag g 1251

<210> 73

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 73

aattgatatc agcgcccccg ag 22

<210> 74

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 74

aattgatatc agggaacgtg accttct 27

<210> 75

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 75

aattgatatc cagaaggtca cgttcag 27

<210> 76

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 76

aattcctcga gtcacacata catggc 26

<210> 77

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 77

aattgatatc tccatctccg gctatga 27

<210> 78

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína sintética

<400> 78

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Ala Asp Ile Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp Pro Thr Thr Val Ala
50 55 60

Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala Arg Ile Ser Trp Leu

65 70 75 80

Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln Val Ser Gly Thr Leu

85 90 95

Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr Leu Val Pro Ser Gly

100 105 110

Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe

115 120 125

Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser Val Arg Tyr Pro Pro

130 135 140

Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp Tyr Leu Gly Arg Thr

145 150 155 160

Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly

165 170 175

Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro Thr Ser Ala Val Ala

180 185 190

Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp Ser Leu Phe Asn Thr

195 200 205

Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly Met Gly Arg Ala Glu

210 215 220

Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr Ala Gly Ala Gly Ala

225 230 235 240

Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala Ile Ile Ala Thr Ala

245 250 255

Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln Gln Arg Lys Glu Gln

260 265 270

Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu Glu Gly Pro Pro Ser

275 280 285

Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu Ala Gln Glu Met Pro

290 295 300

Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His Ser Pro Leu Lys Thr

703

305 310 315 320

Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu Gln Glu Met Pro Arg

325 330 335

Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser Gly Pro Leu His Pro

340 345 350

Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val Pro Pro Gly Pro Pro

355 360 365

Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu

370 375 380

Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile Tyr Asp Ala Leu Ser

385 390 395 400

Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys Gly Phe Val Met Ser

405 410 415

Arg Ala Met Tyr Val

420

<210> 79

<211> 1263

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN Sintético

<400> 79

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcgctgat atccagaagg tcacgttcag ccaggaccct 180

acgacagtgg ccctctgcat ctccaaagag ggccgcccac ctgcccggat ctcctggctc 240

tcatccctgg actgggaagc caaagagact caggtgtcag ggaccctggc cggaactgtc 300

actgtcacca gccgcttcac cttggtgccc tcgggccgag cagatggtgt cacggtcacc 360

tgcaaagtgg agcatgagag cttcgaggaa ccagccctga tacctgtgac cctctctgta 420

cgctaccctc ctgaagtgtc catctccggc tatgatgaca actggtacct cggccgtact 480

gatgccaccc tgagctgtga cgtccgcagc aacccagagc ccacgggcta tgactggagc 540

acgacctcag gcaccttccc gacctccgca gtggcccagg gctcccagct ggtcatccac 600

gcagtggaca gtctgttcaa taccaccttc gtctgcacag tcaccaatgc cgtgggcatg 660

ggccgcgctg agcaggtcat ctttgtccga gagaccccca acacagcagg cgcaggggcc 720

acaggcggca tcatcggggg catcatcgcc gccatcattg ctactgctgt ggctgccacg 780

ggcatcctta tctgccggca gcagcggaag gagcagacgc tgcaggggc agaggaggac 840

gaagacctgg agggacctcc ctcctacaag ccaccgaccc caaaagcgaa gctggaggca 900

caggagatgc cctcccagct cttcactctg ggggcctcgg agcacagccc actcaagacc 960

ccctactttg atgctggcgc ctcatgcact gagcaggaaa tgcctcgata ccatgagctg 1020

cccaccttgg aagaacggtc aggacccttg caccctggag ccacaagcct ggggtccccc 1080

atcccggtgc ctccagggcc acctgctgtg gaagacgttt ccctggatct agaggatgag 1140

gaggggagg aggaggaaga gtatctggac aagatcaacc ccatctatga tgctctgtcc 1200

tatagcagcc cctctgattc ctaccagggc aaaggctttg tcatgtcccg ggccatgtat 1260

gtg 1263

<210> 80

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína sintética

<400> 80

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro

1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln

20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly

35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr

50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln

65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
85 90 95
Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
100 105 110
Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
115 120 125
Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
130 135 140
Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160
Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Pro Asp Ile
165 170 175
Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala
180 185 190
Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp
195 200 205
Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly
210 215 220
Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe
225 230 235 240

Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly Met Gly Arg Ala Glu Gln Val
245 250 255
Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly
260 265 270
Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala
275 280 285
Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu
290 295 300
Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys
305 310 315 320

Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln
325 330 335
Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr
340 345 350
Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu Gln Glu Met Pro Arg Tyr His
355 360 365
Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser Gly Pro Leu His Pro Gly Ala
370 375 380
Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val
385 390 395 400
Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu
405 410 415
Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser
420 425 430
Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys Gly Phe Val Met Ser Arg Ala
435 440 445
Met Tyr Val
450

<210> 81
<211> 1353
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> ADN Sintético
<400> 81

atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60
ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120
gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180
cctggactgt acatttccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240
aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300
gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttcc ctgatatctc catctccggc 540

tatgatgaca actggtacct cggccgtact gatgccaccc tgagctgtga cgtccgcagc 600

aacccagagc ccacgggcta tgactggagc acgacctcag gcaccttccc gacctccgca 660

gtggcccagg gctcccagct ggtcatccac gcagtggaca gtctgttcaa taccaccttc 720

gtctgcacag tcaccaatgc cgtgggcatg ggccgcgctg agcaggtcat ctttgtccga 780

gagaccccca acacagcagg cgcaggggcc acaggcggca tcatcggggg catcatcgcc 840

gccatcattg ctactgctgt ggctgccacg ggcatcctta tctgccggca gcagcggaag 900

gagcagacgc tgcaggggggc agaggaggac gaagacctgg agggacctcc ctcctacaag 960

ccaccgaccc caaaagcgaa gctggaggca caggagatgc cctcccagct cttcactctg 1020

ggggcctcgg agcacagccc actcaagacc ccctactttg atgctggcgc ctcatgcact 1080

gagcaggaaa tgcctcgata ccatgagctg cccaccttgg aagaacggtc aggacccttg 1140

caccctggag ccacaagcct ggggtccccc atcccggtgc ctccagggcc acctgctgtg 1200

gaagacgttt ccctggatct agaggatgag gaggggggagg aggaggaaga gtatctggac 1260

aagatcaacc ccatctatga tgctctgtcc tatagcagcc cctctgattc ctaccagggc 1320

aaaggctttg tcatgtcccg ggccatgtat gtg 1353

<210> 82

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 82

agctgggccg ggagagcaga aca 23

<210> 83

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 83

aaatgggatg cacgtgtgtt aactgac 27

<210> 84

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 84

agagcagaac agggaggcta gag 23

<210> 85

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 85

caagaaagct aagggatcaa caggtgag 28

<210> 86

<211> 538

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 86

Met Ala Arg Ala Val Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Lys Thr Gly Ala Gln
20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr

50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Pro Asp His Gln
65 70 75 80
Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
85 90 95
Lys Pro Gly Ser Gln Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
100 105 110
Arg Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu Arg
115 120 125
Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
130 135 140
Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160
Lys Pro Gln Asn His Ala Glu Ala Gln Glu Val Thr Phe Ser Gln Asp
165 170 175
Pro Val Pro Val Ala Arg Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
180 185 190
Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
195 200 205
Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225 230 235 240
Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
245 250 255
Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
260 265 270
Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val His Ser Asn
275 280 285
Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Ile Phe Pro

290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
340 345 350

Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala
355 360 365

Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
370 375 380

Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
385 390 395 400

Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
405 410 415

Glu Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
420 425 430

Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
435 440 445

Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
450 455 460

Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
465 470 475 480

Pro Pro Gly Pro Pro Val Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp
485 490 495

Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Val
500 505 510

Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly Lys
515 520 525

Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
530 535

<210> 87

<211> 1614

<212> ADN

<213> Macaca fascicularis

<400> 87

atggcccggg ccgttgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60

ctgctgctgc tgctgctccg gaaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtactaccc 120

gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180

cctggactgt acatctccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctcc agaccaccag 240

aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcccggcagc 300

cagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactaggc aagacacaga ggcggagctc 360

caggacgcca cgctggccct ccgcgggctc acggtggagg acgaaggcaa ctacacctgc 420

gagtttgcca ccttccccaa ggggtcggtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480

aagccccaga accacgctga ggcccaggag gtcacgttca gccaggaccc tgtgccagtg 540

gcccgctgca tctccaaaga gggtcgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600

gactgggaag ccaaagagac ccaggtatca gggaccctgg ccggcactgt caccgtcacc 660

agccgcttca ccttggtccc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720

gagcatgaga gcttcgagga gccagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780

cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840

ctgagctgtg acgtccacag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900

ggcatcttcc caacctccgc agtagcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcggtggac 960

agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020

gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacgggcggc 1080

atcatcgggg gcatcatcgc cgccatcatt gcgactgctg tggctgccac gggcatcctt 1140

atctgccggc agcagcggaa ggagcagacg ctgcaggggg cagaggagga tgaagaccta 1200

gagggacctc cctcctacaa gccaccgacc ccaaaagcga agctggagga gcaggagatg 1260

ccctcccagc tcttcactct gggggcctcg gagcacagcc cactcaagac cccctacttt 1320

gacgctggcg cctcatgcac tgagcaggaa atgcctcgat accatgaatt gcccactttg 1380

gaagagcggt caggaccccct gcaccctgga gccacaagcc tgggatcccc catcccggtg 1440

cctccagggc cacctgttgt ggaagacgtt tccctggatc tagaggatga ggaggggggag 1500

gaggaggaag agtatctgga taagatcaac cccgtctacg atgctctgtc ctacagcagc 1560

ccctctgatt cctaccaggg caaaggcttt gtcatgtccc gggccatgta cgtg 1614

<210> 88

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 88

aattgaattc atggcccggg ccgtt 25

<210> 89

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 89

aattctcgag tcacacgtac atggcccggg a 31

<210> 90

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 90

agaagcttgc caccatggcc cgggccgctg ccctcc 36

<210> 91

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 91

cattctggtg gtctggaggt gcatc 25

<210> 92

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 92

gagaattctc acacatacat ggcccgggac atg 33

<210> 93

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 93

gatgcacctc cagaccacca gaatg 25

<210> 94

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 94

ctgtgtcttg cctagtgctc tg 22

<210> 95

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 95

cagagcacta ggcaagacac ag 22

<210> 96

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 96

cgtgagcccg cggagggcca g 21

<210> 97

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 97

ctggccctcc gcgggctcac g 21

<210> 98

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 98

ggatgtgcga gttgcagtgc tacccgag 28

<210> 99

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 99

ctcgggtagc actgcaactc gcacatcc 28

<210> 100

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 100

gagttcaagt gctaggcgag gtgcgaggcc 30

<210> 101

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 101

ggcctcgcac ctcgcctagc acttgaactc 30

<210> 102

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 102

ccgaggtgcg aggcgcgctc gggggcaccg 30

<210> 103

<211> 30

<212> ADN

f16.

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 103

cggtgccccc gagcgcgcct cgcacctcgg 30

<210> 104

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 104

tggagctgcc gtgcgccctg ctgccacctg 30

<210> 105

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 105

caggtggcag cagggcgcac ggcagctcca 30

<210> 106

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 106

ctgctgccac ctgctcctgg actgtac 27

<210> 107

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 107

gtacagtcca ggagcaggtg gcagcag 27

<210> 108

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 108

ctgttcctgg actggccatc tccctggtga 30

<210> 109

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 109

tcaccaggga gatggccagt ccaggaacag 30

<210> 110

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 110

cctggtgacc tgggcgcgcc cagatgcac 29

<210> 111

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 111

gtgcatctgg gcgcgcccag gtcaccagg 29

<210> 112

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

400> 112

gcagcgccca gatggacctg cgaaccacc 29

<210> 113

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 113

ggtggttcgc aggtccatct gggcgctgc 29

<210> 114

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 114

gcgcccagat gcaggtgcga accaccag 28

719

<210> 115

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 115

ctggtggttc gcacctgcat ctgggcgc 28

<210> 116

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 116

gcccagatgc acctgggaac caccagaatg 30

<210> 117

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 117

cattctggtg gttcccaggt gcatctgggc 30

<210> 118

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 118

cagatgcacc tgcggcccac cagaatgtgg 30

<210> 119

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 119

ccacattctg gtgggccgca ggtgcatctg 30

<210> 120

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 120

atgcacctgc gaacgcccag aatgtggccg 30

<210> 121

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 121

cggccacatt ctgggcgttc gcaggtgcat 30

<210> 122

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 122

cctgcgaacc acgcgaatgt ggccgc 26

<210> 123

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 123

gcggccacat tcgcgtggtt cgcagg 26

<210> 124

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 124

ctgcgaacca ccaggctgtg gccgccttcc 30

<210> 125

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 125

ggaaggcggc cacagcctgg tggttcgcag 30

<210> 126

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 126

ccgccttcca ccctgcgatg ggtcccagct 30

<210> 127

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 127

agctgggacc catcgcaggg tggaaggcgg 30

<210> 128

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 128

gtcccagctt ccccgccccg aagcctggca 30

<210> 129

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 129

tgccaggctt cggggcgggg aagctgggac 30

<210> 130

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 130

ccttcgtctc tgccgcgcag agcactgggc 30

<210> 131

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 131

gcccagtgct ctgcgcggca gagacgaagg 30

<210> 132

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 132

tgggcaagac acagcggcag agctccagg 29

<210> 133

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 133

cctggagctc tgccgctgtg tcttgccca 29

<210> 134

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 134

ggcagagctc caggccgcca cgctggccc 29

<210> 135

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 135

gggccagcgt ggcggcctgg agctctgcc 29

<210> 136

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 136

ccacgctggc cctcgccggg ctcacggtgg 30

<210> 137

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 137

ccaccgtgag cccggcgagg gccagcgtgg 30

<210> 138

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 138

ggaggacgag ggcgcctaca cttgcgag 28

<210> 139

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 139

ctcgcaagtg taggcgccct cgtcctcc 28

<210> 140

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 140

gcgagtttgc caccgccccc aaggggtccg 30

<210> 141

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 141

cggacccctt gggggcggtg gcaaactcgc 30

<210> 142

726.

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 142

ttgccacctt ccccgcgggg tccgtccgag 30

<210> 143

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 143

ctcggacgga ccccgcgggg aaggtggcaa 30

<210> 144

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 144

cccaaggggt ccgcccgagg gatgacc 27

<210> 145

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 145

ggtcatccct cgggcggacc ccttggg 27

727

<210> 146

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 146

ggtccgtccg aggggcgacc tggctcagag 30

<210> 147

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 147

ctctgagcca ggtcgcccct cggacggacc 30

<210> 148

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 148

ccgtccgagg gatggcctgg ctcagagtc 29

<210> 149

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 149

728

gactctgagc caggccatcc ctcggacgg 29

<210> 150

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 150

ccaagcccaa gaacgcagct gaggcccaga 30

<210> 151

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 151

tctgggcctc agctgcgttc ttgggcttgg 30

<210> 152

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 152

aagctgaggc ccaggcggtc acgttcagcc 30

<210> 153

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 153

ggctgaacgt gaccgcctgg gcctcagctt 30

<210> 154

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 154

cccagaaggt cacggccagc caggacccta 30

<210> 155

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 155

tagggtcctg gctggccgtg accttctggg 30

<210> 156

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 156

cgttcagcca ggacggtacg acagtggccc 30

<210> 157

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 157

gggccactgt cgtaccgtcc tggctgaacg 30

<210> 158

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 158

cagtggccct ctgcgcctcc aaagagggcc 30

<210> 159

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 159

ggccctcttt ggaggcgcag agggccactg 30

<210> 160

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 160

ccctctgcat ctccgcagag ggccgcccac 30

<210> 161

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 161

gtgggcggcc ctctgcggag atgcagaggg 30

<210> 162

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 162

cccggatctc ctgggcctca tccctggact 30

<210> 163

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 163

agtccaggga tgaggcccag gagatccggg 30

<210> 164

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 164

tctcatccct ggacgcggaa gccaaagaga 30

<210> 165

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 165

tctctttggc ttccgcgtcc agggatgaga 30

<210> 166

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 166

ctgggaagcc aaagcgactc aggtgtcag 29

<210> 167

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 167

ctgacacctg agtcgctttg gcttcccag 29

<210> 168

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 168

ctcaggtgtc aggggccctg gccggaact 29

<210> 169

<211> 29

733

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 169

agttccggcc agggcccctg acacctgag 29

<210> 170

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 170

gagcagatgg tgtcgcggtc acctgcaaa 29

<210> 171

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 171

tttgcaggtg accgcgacac catctgctc 29

<210> 172

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 172

tcacggtcac ctgcgcagtg gagcatgaga 30

<210> 173

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 173

tctcatgctc cactgcgcag gtgaccgtga 30

<210> 174

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 174

cttcgaggaa ccaggcctga tacctgtga 29

<210> 175

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 175

tcacaggtat caggcctggt tcctcgaag 29

<210> 176

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 176

caaaagcttg ccgccaccat gaaacacctg tggttcttc 39

<210> 177

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 177

aaaatgaatt ctcatttacc cggagacag 29

<210> 178

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 178

ataaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gtc 33

<210> 179

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 179

ccggaattcc taacactctc ccctgttgaa gctctttg 38

<210> 180

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 180

caaaagcttg ccgccaccat ggaarcccca gckcag 36

<210> 181

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 181

caaaagcttg ccgccaccat ggaactgggg ctccg 35

<210> 182

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 182

caaaagcttg ccgccaccat gttgccatca 30

<210> 183

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 183

aagtagtcct tgaccaggc 19

<210> 184

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Ser Tyr Tyr Trp Ser

737

1 5

<210> 185

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 185

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 186

Asp Gly Gly Asp Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 187

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 187

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

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ala Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

738

85 90 95

Arg Asp Gly Gly Asp Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 188

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 188

agttactact ggagc 15

<210> 189

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 189

tatatctatt acagtgggag caccaaccac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 190

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 190

gatggtgggg acgactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 191

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 191

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

atctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caaccacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgg ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatggtggg 300

gacgactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 192

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa Leu Ala

1 5 10

<210> 193

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 193

Asp Ala Ser Ser Leu Xaa Ser

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

140

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<220>

<221> características_varias

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 194

Gln Gln Xaa Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr

1 5

<210> 195

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<220>

<221> características_varias

<222> (46)..(46)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<220>

<221> características_varias

<222> (55)..(55)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<220>

<221> características_varias

<222> (58)..(58)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<220>

<221> características_varias

<222> (91)..(91)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<220>

<221> características_varias

<222> (96)..(96)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 195

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Xaa Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Xaa Ser Gly Xaa Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Asn Ser Tyr Pro Xaa
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 196

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 196

cgggcragtc agggcattag cagygsktta gcc 33

<210> 197

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 197

gatgcmtcca gtttgsaaag t 21

<210> 198

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 198

caacagtwta atagttaccc tyggacg 27

<210> 199

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 199

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgyc gggcragtca gggcattagc agygskttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagytcct gatctatgat gcmtccagtt tgsaaagtgg grtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcatcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag twtaatagtt accctyggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 200

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Ser Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 201

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 202

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 203

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 204

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 204

agttactact ggacc 15

<210> 205

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 205

tatgtctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 206

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 206

gaccctgggg aagactacta ctacggtatg gacgtc 36

<210> 207

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 207

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattggatat gtctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 208

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 208

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa Leu Ala

1 5 10

<210> 209

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 210

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 211

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 211

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 212

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 212

cgggcaagtc agggcattag cagtgsttta gcc 33

<210> 213

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 213

gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 214

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 214

caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 215

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 215

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgstttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 216

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 216

Ser Tyr Asn Met Asn

1 5

<210> 217

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 217

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

148

1 5 10 15

Gly

<210> 218

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 218

Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 219

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 220

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 220

agctataaca tgaac 15

<210> 221

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 221

tccattagta gtagtagtag ttacatatac tacgcagact cagtgaaggg c 51

<210> 222

<211> 39

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 222

gattactatg gttcggggac ttattatctc tttgactac 39

<210> 223

<211> 369

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 223

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctataaca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180

gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagattac 300

tatggttcgg ggacttatta tctctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcc 369

150

<210> 224

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 224

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 225

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 225

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 226

His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile Thr

1 5

<210> 227

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 227

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 228

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 228

cgggccagtc agagcattgg tagtagctta cac 33

<210> 229

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 229

tatgcttccc agtccttctc a 21

<210> 230

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 230

catcagagta ggagtttacc gatcacc 27

<210> 231

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 231

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtaggagtt taccgatcac cttcggccaa 300

gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 232

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 232

Ser Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 233

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 233

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 234

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 234

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 235

<211> 121

153.

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 236

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 236

agttactact ggacc 15

<210> 237

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 237

tatatctatt acagtgggag caccaactcc aacccctccc tcaagagt 48

<210> 238

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 238

gaccctgggg aagactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 239

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 239

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cttgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactccaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 240

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 240

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 241

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 241

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 243

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 243

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 244

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 244

cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 245

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 245

gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 246

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 246

caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 247

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 247

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 248

<211> 5

<212> PRT

757

<213> Homo sapiens

<400> 248

Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 249

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 249

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 250

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 250

Asp Ala Gly Glu Asp Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 251

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 251

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Ser Ala Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Ala Gly Glu Asp Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 252
<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 252
agttactact ggagc 15

<210> 253
<211> 48
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 253
tatatctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 254
<211> 36
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 254
gatgctgggg aggactactc ctacggtatg gacgtc 36

<210> 255
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 255

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctagtgc ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgctggg 300

gaggactact cctacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 256

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 257

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 258

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 258

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Arg Thr

1 5

<210> 259

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 259

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 260

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 260

cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 261

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 261

gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 262

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 262

caacagttta atagttaccg gacg 24

<210> 263

<211> 318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 263

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accggacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 264

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 264

Ser Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 265

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 266

f62

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 266

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 267

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr

85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 268

<211> 15

<212> ADN

763

<213> Homo sapiens

<400> 268

agttactact ggacc 15

<210> 269

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 269

tatatctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 270

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 270

gaccctgggg aagactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 271

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 271

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cttgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 272

<211> 11

764

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 273

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 274

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 275

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

765.

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 276

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 276

cgggcragtc agggyattag cagygcttta gcc 33

<210> 277

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 277

gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 278

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 278

caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 279

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 279

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

766

atcacttgcc gggcragtca gggyattagc agygctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 280

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 280

Ser Tyr Xaa Trp Thr

1 5

<210> 281

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 282

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 283

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_varias

<222> (33)..(33)

<223> Xaa puede ser cualquier presentación natural de un aminoácido

<400> 283

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Xaa Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Glu Asp Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 284

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 284

agttacwact ggacc 15

<210> 285

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 285

tatatctatt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 286

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 286

gaccctgggg aagactacaa ctacggtatg gacgtc 36

<210> 287

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 287

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cttgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacwact ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agaccctggg 300

gaagactaca actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

gcc 363

<210> 288

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

769

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 289

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 289

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 290

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 290

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 291

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 291

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 292

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 292

cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 293

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 293

gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 294

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 294

caacagttta atagttaccc tcggacg 27

<210> 295

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 295

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 296

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 296

Ser Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 297

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 297

Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 298

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 298

Gly Ile Ala Gly Met Asp Val

1 5

<210> 299

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 299

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

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

<210> 300
<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 300
agttactatt ggacc 15

<210> 301
<211> 48
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 301
tatatctttt acagtgggag caccaactac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 302
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 302

ggtatagcag gtatggacgt c 21

<210> 303

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 303

caggtgcaac tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcaga agttactatt ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atcttttaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtgctccctg 240

aagctgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgaa aggtatagca 300

ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctcagcc 348

<210> 304

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 304

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 305

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 305

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 306

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 306

His Gln Ser Arg Ser Leu Pro Ile Thr
1 5

<210> 307
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 307

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

<210> 308
<211> 36
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 308

agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

<210> 309
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 309

ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 310

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 310

cagcagtatg gtagctcacc gtacact 27

<210> 311

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 311

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 300

caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 312

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 312

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

1 5 10

<210> 313

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 313

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr

1 5 10

<210> 314

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 314

atgaaacacc tgtggttctt c 21

<210> 315

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 315

atggaaaccc cagcgcag 18

<210> 316

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 316

ggatgaattc tcatttaccc ggagacaggg 30

<210> 317

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 317

ccggaattcc taacactctc ccctgttg 28

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

111

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-803-2	FERM BP-10417

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on September 16, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: September 16, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566 JAPAN

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10417 Date of Accession: September 16, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 5, 2005. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 5, 2005

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

719

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-244-3	FERM BP-10423

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on October 4, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: October 4, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

f80

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10423 Date of Accession: October 4, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 26, 2005. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 26, 2005

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

781

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-530-1	FERM BP-10424

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on October 4, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: October 4, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

482

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10424 Date of Accession: October 4, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 26, 2005. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 26, 2005

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

183.

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-903-1	FERM BP-10425

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on October 4, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: October 4, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

784

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10425 Date of Accession: October 4, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 26, 2005. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 26, 2005

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-520-1	FERM BP-10426

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on October 4, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: October 4, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

786.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10426 Date of Accession: October 4, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test
Was performed in October 26, 2005. As a result, said microorganism was

[x] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 26, 2005

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-845-2	FERM BP-10427

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on October 4, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: October 4, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10427 Date of Accession: October 4, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 26, 2005. As a result, said microorganism was

[x] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 26, 2005

789

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-834-1	FERM BP-10428

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on October 4, 2005 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: October 4, 2005

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

¥90

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10428 Date of Accession: October 4, 2005

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 26, 2005. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: October 26, 2005

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

¥91

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-554-1	FERM BP-10681

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on September 20, 2006 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under I above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: September 20, 2006

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

792

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10681 Date of Accession: September 20, 2006

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 11, 2006. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: November 17, 2006

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

793

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-769-2	FERM BP-10682

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on September 20, 2006 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: September 20, 2006

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

194

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10682 Date of Accession: September 20, 2006

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 11, 2006. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: November 17, 2006

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

19s.

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-964-1	FERM BP-10683

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on September 20, 2006 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: September 20, 2006

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

196.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10683 Date of Accession: September 20, 2006

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test
Was performed in October 11, 2006. As a result, said microorganism was

[x] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: November 17, 2006

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-1302-2	FERM BP-10684

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on September 20, 2006 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: September 20, 2006

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

198

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10684 Date of Accession: September 20, 2006

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 11, 2006. As a result, said microorganism was

[x] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: November 17, 2006

799

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec8-4116-8	FERM BP-10685

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September 20, 2006 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: September 20, 2006

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

800

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10685 Date of Accession: September 20, 2006

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in October 11, 2006. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: November 17, 2006

801

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Nec1-1044-4	FERM BP-10805

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on April 3, 2007 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: April 3, 2007

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

302

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10805 Date of Accession: April 3, 2007

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in April 25, 2007. As a result, said microorganism was

[x] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: May 16, 2007

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

803

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR: Nec8-3517-11

Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: FERM BP-10806

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on April 3, 2007 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: April 3, 2007

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

804

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10806 Date of Accession: April 3, 2007

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in April 25, 2007. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: May 16, 2007

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

805

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:
Nec8-3704-7

Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
FERM BP-10807

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

[×] a scientific description

[×] a proposed taxonomic designation

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received by it on April 3, 2007 (date of the original deposit).

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

This International Depositary Authority accepted the microorganism identified under 1 above, which was received by it on - - - - - (date of the original deposit), and received a request for conversion to a deposit under the Budapest Treaty from the original deposit on - - - - -.

V.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Date: April 3, 2007

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page.

To: Depositor

Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representative

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

1. Depositor	2. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representative Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi	Accession number: FERM BP-10807 Date of Accession: April 3, 2007

3. Result of the viability test

With regard to a viability of the microorganism in the second column, a viability test Was performed in April 25, 2007. As a result, said microorganism was

[×] Viable

[ ] Not viable

4. Conditions used in the viability test (only in the case where the result is negative)

[ ] Copy of a record on conditions with regard to a microorganism 1

5.INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Dr. Masakazu Yamaoka, Director

Address: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN

Date: May 16, 2007

107

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-803-2
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10417

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 16 de Septiembre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Septiembre 16, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

808

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10417. Fecha de Acceso: Septiembre 16, 2005.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 5, 2005. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dirección: Dr. Masakazu Yamaoka, Director
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Octubre 5, 2005.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

809

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-244-3
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10423

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 4 de Octubre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Octubre 4, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

810

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10423. Fecha de Acceso: Octubre 4, 2005.
3. Resultado de la prueba de viabilidad. Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 26, 2005. Como resultado, este microorganismo fue: [X] Viable. [ ] No Viable.	
4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo). [ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1	
5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL. Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, Director Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN. Fecha: Octubre 26, 2005.	

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

811

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-530-1
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10424

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 4 de Octubre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Octubre 4, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

812

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10424. Fecha de Acceso: Octubre 4, 2005.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 26, 2005. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dirección: Dr. Masakazu Yamaoka, Director
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Octubre 26, 2005.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

813

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-903-1
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10425

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 4 de Octubre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Octubre 4, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

8/14

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10425. Fecha de Acceso: Octubre 4, 2005.
3. Resultado de la prueba de viabilidad. Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 26, 2005. Como resultado, este microorganismo fue: [X] Viable. [ ] No Viable.	
4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo). [ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1	
5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL. Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, Director Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN. Fecha: Octubre 26, 2005.	

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

815.

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-520-1
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10426

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 4 de Octubre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Octubre 4, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

816

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10426. Fecha de Acceso: Octubre 4, 2005.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 26, 2005. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dirección: Dr. Masakazu Yamaoka, Director
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Octubre 26, 2005.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

817

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-845-2
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10427

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 4 de Octubre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Octubre 4, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

818

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10427. Fecha de Acceso: Octubre 4, 2005.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 26, 2005. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Octubre 26, 2005.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

819

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-834-1
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10428

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 4 de Octubre de 2005 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Octubre 4, 2005.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

820

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10428. Fecha de Acceso: Octubre 4, 2005.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 26, 2005. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dirección: Dr. Masakazu Yamaoka, Director
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Octubre 26, 2005.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

821

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-554-1
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10681

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 20 de Septiembre de 2006 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Septiembre 20, 2006.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

822

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10681. Fecha de Acceso: Septiembre 20, 2006.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 11, 2006. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dirección: Dr. Masakazu Yamaoka, Director
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Noviembre 17, 2006.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

823.

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-769-2
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10682

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 20 de Septiembre de 2006 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Septiembre 20, 2006.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

824

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10682. Fecha de Acceso: Septiembre 20, 2006.
3. Resultado de la prueba de viabilidad. Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 11, 2006. Como resultado, este microorganismo fue: [X] Viable. [ ] No Viable.	
4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo). [ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1	
5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL. Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, Director Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN. Fecha: Noviembre 17, 2006.	

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

425

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-964-1 Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10683
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por: [X] una descripción científica [X] una designación taxonómica propuesta.
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 20 de Septiembre de 2006 (fecha del depósito original).
IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Septiembre 20, 2006. Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

826

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10683. Fecha de Acceso: Septiembre 20, 2006.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 11, 2006. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dirección: Dr. Masakazu Yamaoka, Director
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Noviembre 17, 2006.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

827

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-1302-2 Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10684
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por: [X] una descripción científica [X] una designación taxonómica propuesta.
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 20 de Septiembre de 2006 (fecha del depósito original).
IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Septiembre 20, 2006. Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

828

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10684. Fecha de Acceso: Septiembre 20, 2006.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 11, 2006. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Noviembre 17, 2006.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

829

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec8-4116-8
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10685

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 20 de Septiembre de 2006 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Septiembre 20, 2006.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

830

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10685. Fecha de Acceso: Septiembre 20, 2006.
3. Resultado de la prueba de viabilidad. Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Octubre 11, 2006. Como resultado, este microorganismo fue: [X] Viable. [ ] No Viable.	
4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo). [ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1	
5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL. Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, Director Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN. Fecha: Noviembre 17, 2006.	

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

821

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec1-1044-4
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10805

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 3 de Abril de 2007 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Abril 3, 2007.

Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

882

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10805. Fecha de Acceso: Abril 3, 2007.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Abril 25, 2007. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Mayo 16, 2007.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

833.

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec8-3517-11
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10806

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 3 de Abril de 2007 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Abril 3, 2007.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

834

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10806. Fecha de Acceso: Abril 3, 2007.
3. Resultado de la prueba de viabilidad. Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Abril 25, 2007. Como resultado, este microorganismo fue: [X] Viable. [ ] No Viable.	
4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo). [ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1	
5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL. Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) Dr. Masakazu Yamaoka, Director Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN. Fecha: Mayo 16, 2007.	

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
expedido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada en la parte inferior de esta página

Para: Depositante
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited

835

Yasuchika Hasegawa
Representante
Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Nec8-3704-7
Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: FERM BP-10807

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en el I anterior fue acompañado por:
[X] una descripción científica
[X] una designación taxonómica propuesta.

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el 3 de Abril de 2007 (fecha del depósito original).

IV. RECEPCIÓN DE PETICIÓN PARA CONVERSIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional aceptó el microorganismo identificado en I anterior, el cual fue recibido por ella el _____ (fecha del depósito original), y recibió una petición para conversión hasta un depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest a partir del depósito original el _____.

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, DIRECTOR Fecha: Abril 3, 2007.
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

836

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISOS PARA LOS PROPÓSITOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD
Expedida de acuerdo con la Regla 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la siguiente página.

Para: Depositante.
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited
Yasuchika Hasegawa.
Representante

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.

1. Depositante	2. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Takeda Pharmaceutical Company Limited Yasuchika Hasegawa, Representante Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi.	Número de acceso: FERM BP-10807. Fecha de Acceso: Abril 3, 2007.

3. Resultado de la prueba de viabilidad.

Con respecto a una viabilidad del microorganismo en la segunda columna, se llevó a cabo una prueba de viabilidad en Abril 25, 2007. Como resultado, este microorganismo fue:

[X] Viable.
[ ] No Viable.

4. Condiciones empleadas en la prueba de viabilidad (solamente en el caso en donde el resultado sea negativo).

[ ] Copia de un registro sobre las condiciones con respecto a un microorganismo: 1

5. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL.

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada)

Dr. Masakazu Yamaoka, Director
Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 JAPÓN.

Fecha: Mayo 16, 2007.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069908

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/32(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07K16/18*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/02*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/32, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/18, C12N5/10, C12N15/02, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2005/097204 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 20 October, 2005 (20.10.05), Full text & EP 1733743 A1 & CA 2561947 A1	1,2,7,10-12, 15,21-26, 32-34/3-6,8, 9,13,14, 16-20,27, 35-47
Y	EBERLE F. ET AL, The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene., Gene, 1995, Vol.159, No.2, p.267-272, full text	1-27,32-47
Y	PENDE D. ET AL, PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis., Mol. Immunol., 2005, Vol.42, No.4, p.463-469, full text	1-27,32-47

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 October, 2007 (23.10.07)	06 November, 2007 (06.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

838

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069908

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAHARA-HANAOKA S. ET AL, Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)., Int. Immunol., 2004, Vol.16, No.4, p.533-538, full text	1-27,32-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069908

Box No. II **Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 28-31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in the above claims involve methods for treatment of the human body by therapy.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III **Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

- [ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- [ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- [ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

840

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2007/069908

RECEIVED
'09. 4. 13
PCT Abe, Ikubo & Katayama

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KOBAYASHI, Hiroshi
c/o ABE, IKUBO & KATAYAMA
Fukuoka Bldg. 9th Fl.
8-7, Yaesu 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 1040028
JAPON

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing *(day/month/year)* 27 March 2009 (27.03.2009)	
Applicant's or agent's file reference PCT07-0057	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP2007/069908	International filing date *(day/month/year)* 04 October 2007 (04.10.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
1)SATO, Shuji 2)OSHIMA, Tsutomu 3)KUROKAWA, Tomofumi c/o TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED 17-85, Jusohonmachi 2-chome Yodogawa-ku, Osaka-shi Osaka 5328686 Japan	JP	JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
1)SATO, Shuji 2)OSHIMA, Tsutomu 3)KUROKAWA, Tomofumi c/o Takeda San Francisco, Inc. 285 East Grand Ave. South San Francisco CA 94080-4804 United States of America	JP	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 90 90	Authorized officer Asakura Yo e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/DZ6SK8IX0

841

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **C07K 016/032**
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**
(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País*** **PCT/JP2006/320429 06/10/2006 JP** **P-070101453 04/04/2007 AR** **2007-100876 06/04/2007 JP**	(72) Inventor(es) **SHUJI SATO Y OTROS**
	(74) Apoderado: **EMILIO FERRERO**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 06/05/2009 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 04/10/2007 No. de solicitud PCT/JP2007/069908	(87) Publicación internacional Fecha: 17/04/2008 N° publicación: ***WO 2008/044754 A1***

(54) Titulo: **AGENTE PARA PREVENIER/TRATAR EL CÁNCER**

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal contra una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal humano.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal quimérico.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal humanizado.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal perteneciente a la subclase de la IgG_1 humana.

7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual tiene actividad inhibidora del crecimiento de células cancerosas.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual presenta citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual tiene actividad inhibidora de la unión trans de nectina-2/nectina-3 o de nectina-2/nectina-2.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el epítope presente en las secuencias de aminoácidos 1 a 350 representadas por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el epítope presente en las secuencias de aminoácidos 47 a 142 o 175 a 240 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3.

12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer la secuencia de aminoácidos que contiene por lo menos uno de los residuos de los aminoácidos 75, 76, 77, 78, 95, 137, 145, 173, 184, 186 y 212 de las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3.

13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une en forma competitiva con un anticuerpo monoclonal producido por la célula del hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1(FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427), Nec1-834-1(FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685), a la proteína que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o por la SEQ ID NO: 3, su péptido parcial o una sal del mismo.

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es capaz de reconocer la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo monoclonal producido por la célula del hibridoma representada por Nec1-803-2 (FERM BP-10417), Nec1-244-3 (FERM BP-10423), Nec1-530-1 (FERM BP-10424), Nec1-903-1 (FERM BP-10425), Nec1-520-1 (FERM BP-10426), Nec1-845-2 (FERM BP-10427) o Nec1-834-1 (FERM BP-10428), Nec1-964-1 (FERM BP-10683), Nec1-1302-2 (FERM BP-10684), Nec1-554-1 (FERM BP-10681), Nec1-769-2 (FERM BP-10682) o Nec8-4116-8 (FERM BP-10685).

~~842~~
843

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 29,809
FECHA : ABRIL 20 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-044621- -00000-0000
Fecha: 2009-05-04 17:02:03 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 844

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105577964	20/04/2009	48,405,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL : $	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO: 14656 - 841 - 045 - 1

~~843~~

844

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-044621- -00000-0000
Fecha: 2009-05-04 17:02:03 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 844

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 24,827
FECHA : MARZO 30 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19774650	30/03/2009	45,049,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	87	SOL RENOVACION REGISTRO CON RECAR	805,000.00
			TOTAL : $	805,000.00

SON: OCHOCIENTOS CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO. 14856- 841- 045-1.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-044621- -00000-0000

Fecha: 2009-05-04 17:02:03 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 844

SUPERINTE... O. A

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [✓]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Sandra Rodriguez
Firma Responsable

Fecha Mayo 4-9.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	9 44621
	Solicitud internacional	PCT/JP2007/069908
	Fecha inicio fase nacional	06/05/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6088

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 MAYO 2009
jfernand