

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 437**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09773163 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2313504**

54 Título: **Anticuerpos anti-CDH3 marcados con etiqueta de radioisótopo y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.06.2008 US 76982 P

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

22.04.2015

73 Titular/es:

**ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (100.0%)
2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku
Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, JP**

72 Inventor/es:

**TOGASHI, AKIRA;
KATSU, MASAKAZU;
TAKAYANAGI, MEGUMI;
YOSHIOKA, HIROKI;
NG, POHSING;
SHIBA, YASUHIRO;
NAKAMURA, YUSUKE y
ENDO, KEIGO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 534 437 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CDH3 marcados con etiqueta de radioisótopo y usos de los mismos

Campo técnico

Prioridad

- 5 La invención se refiere a anticuerpos anti-CDH3 conjugados con etiqueta de radioisótopo, o a composiciones para su uso en procedimientos para dañar células cancerosas.

Técnica anterior

10 Las cadherinas son glucoproteínas de la adhesión célula-célula que forman empalmes intercelulares dependientes del calcio y desempeñan una función esencial en la morfogénesis y en el desarrollo y mantenimiento de tejidos y órganos adultos (Conacci-Sorrell M y col., J Clin Invest, 109:987-91 (2002)). Durante la embriogénesis, la expresión celular de cadherinas específicas produce interacciones homófilas que son críticas en el proceso de la clasificación celular y la estratificación de tejidos (Nose A, y col., Cell, 54:993-1001, (1988), Steinberg MS y col., Proc Natl Acad Sci USA, 91:206-9, (1994), y Takeichi M. Science, 251:1451-5, (1991)). Las alteraciones en estas uniones celulares desempeñan una función importante en la desestabilización celular y pueden modificar el proceso de diferenciación cuidadosamente regulado de las estructuras epiteliales (Daniel CW y col., Dev Biol, 169:511-9 (1995) y Nose A y Takeichi M. J Cell Biol, 103:2649-58 (1986)). Por este motivo, la pérdida funcional o expresión en exceso de cadherinas y los mecanismos moleculares que subyacen el control de los genes que codifican estas proteínas participan en la carcinogénesis (Behrens J. Cancer Metastasis Rev, 18:15-30(1999)).

20 La familia de las cadherinas se subdivide en diversas subfamilias, que incluyen las E-, P- y N-cadherinas clásicas, demostrando cada una una distribución en tejido específica (Takeichi M. Development, 102:639-55 (1988)). Aunque la E-cadherina se expresa en todos los tejidos epiteliales, la expresión de P-cadherina (CDH3) solo está limitada a las capas basales o inferiores de epitelios estratificados, que incluyen próstata y piel, y también a las células mioepiteliales de la mama (Takeichi M. J Cell Biol 103:2649-58 (1986) y Shimoyama Y y col., Cancer Res, 49:2128-33 (1989)).

25 Un conjunto importante de datos también revela ahora que la expresión anómala de la P-cadherina está asociada a proliferación celular y con tumores de colon, mama, pulmón, tiroides y cuello uterino (Gamallo, Modern Pathology, 14:650-654 (2001); y Stefansson y col., J. Clin. Oncol. 22(7):1242-1252 (2004)). Se informó que la P-cadherina humana era el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal NCC-CAD-299 producido contra un carcinoma epidermoide vulvar (Shimoyama y col., Cancer Res., 49:2128-2133 (1989)). Se espera que la modulación de la adhesión y señalización intracelular mediada por P-cadherina produzca disminución en la proliferación y supervivencia de células tumorales *in vivo*. Por consiguiente, en vista de la función crucial que la P-cadherina parece poseer en proliferación celular y la progresión de tumores sólidos, se desea generar anticuerpos para P-cadherina que puedan proporcionar un beneficio terapéutico a pacientes con una variedad de cánceres.

35 Se describieron anticuerpos contra CDH3 (documento WO2007/075672; NL 1031818; Shimoyama, Y. y col. (1989). Cancer Research, 2128-2133; Wu y col. (2008). Experimental Cell Research, 314, 421-429; Mialhe y col. (2000). Journal of Urology, 164, 826-835; Pyo y col. (2007). Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 35, 1-9 y documento EP 1830187).

40 Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales contra moléculas específicas para el cáncer son útiles en el tratamiento del cáncer (Harris, M. (2004). Lancet Oncol, 5, 292-302.). Además de ejemplos satisfactorios de aplicación clínica de los anticuerpos humanizados o quiméricos tales como trastuzumab (Baselga, J. (2001). Oncology, 61, Supl 2 14-21), rituximab (Maloney, D.G. y col. (1997). Blood, 90, 2188-2195) y bevacizumab (Ferrara, N. y col. (2004). Nat Rev Drug Discov, 3, 391-400) para cáncer de mama, linfoma maligno y cáncer de colon, están en desarrollo varios anticuerpos monoclonales contra otras dianas moleculares y están siendo evaluadas sus actividades antitumorales. Se espera que estos anticuerpos monoclonales proporcionen una esperanza a los pacientes que tienen tumores que no tienen tratamiento eficaz. Una de las otras cuestiones importantes para estos anticuerpos monoclonales es el logro de efectos terapéuticos selectivos para células cancerosas sin grave toxicidad debido a su reacción específica con células que expresan moléculas diana (Crist, W.M. y col. (2001). J Clin Oncol, 19, 3091-3102; Wunder, J.S. y col. (1998). J Bone Joint Surg Am, 80,1020-1033; Ferguson, W.S. y Goorin, A.M. (2001). Cancer Invest, 19, 292-315, documentos WO2002/097395, WO2004/110345, WO2006/114704, WO2007/102525).

Sumario de la invención

50 La invención proporciona anticuerpos monoclonales contra CDH3 como se define en las reivindicaciones, que reconocen específicamente el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3. La actividad de unión al tumor *in vivo* de este anticuerpo se demostró usando un sistema *in vivo* de obtención de imágenes fluorescentes con fluorescencia en el infrarrojo cercano, además del procedimiento convencional con radionúclidos. La invención

proporciona evidencia de efecto antitumoral significativo en ratones con xenoinjerto que llevan varias líneas de células cancerosas, en el que los ratones se tratan con una administración única o doble de anticuerpos monoclonales anti-CDH3 marcados con ^{90}Y (clon nº 6) y quiméricos del mismo (quim nº 6).

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

- 5 [1] Un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce específicamente un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es
 - (i) un anticuerpo que comprende regiones variables definidas por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12, o un fragmento de unión del anticuerpo, en el que dicho fragmento de unión comprende regiones variables definidas por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12; o
 - 10 (ii) un anticuerpo definido por CDR de VH que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 14 y 15 y CDR de VL que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17 y 18, o un fragmento de unión del anticuerpo, en el que dicho fragmento de unión comprende CDR de VH que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 14 y 15 y CDR de VL que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17 y 18.
- [2] El anticuerpo o fragmento del mismo según [1], en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo, y anticuerpo monocatenario.
- 20 [3] El anticuerpo o fragmento del mismo según [2], en el que el anticuerpo comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 y/o una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- [4] El anticuerpo o fragmento del mismo según [2], en el que el anticuerpo quimérico comprende una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11.
- 25 [5] El anticuerpo o fragmento del mismo según [2], en el que el anticuerpo quimérico comprende una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- [6] El anticuerpo o fragmento del mismo según [3]; en el que el anticuerpo quimérico comprende una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 y una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- [7] El anticuerpo o fragmento del mismo según [1], en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 30 [8] El anticuerpo o fragmento del mismo según [7], en el que el anticuerpo humanizado comprende además una región FR (región estructural) del anticuerpo humano y/o una región C del anticuerpo humano.
- [9] El anticuerpo o fragmento del mismo según uno cualquiera de [1]-[8], que está conjugado con un citotóxico, un agente terapéutico, una etiqueta de radioisótopo o una etiqueta fluorescente.
- 35 [10] El anticuerpo o fragmento del mismo según [9], en el que la etiqueta de radioisótopo está seleccionada de ^{90}Y (^{90}Y) e ^{111}In (^{111}In).
- [11] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [9] o [10] para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que está asociada a CDH3.
- [12] Uso del anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [9] o [10] para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad que está asociada a CDH3.
- 40 [13] Un procedimiento para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3 o de una predisposición a desarrollar la enfermedad en un sujeto, que comprende
 - (a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con el anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [1]-[10];
 - (b) detectar la proteína CDH3 en la muestra o espécimen; y
 - 45 (c) juzgar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar la enfermedad basándose en la abundancia relativa de la proteína CDH3 en comparación con un control.

[14] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [9] o [10] y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[15] Un kit para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada a CDH3, que comprende el anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [1]-[10].

5 [fig. 1] La Figura 1 muestra los resultados de la expresión de CDH3 en líneas celulares. Los paneles superiores muestran el análisis de citometría de flujo usando cada anticuerpo. KLM-1 y H358 son líneas de células cancerosas positivas para CDH3. MIAPaCa-2 es una línea celular de control negativo. Anti-erbB2 se usa como control positivo. Todos los clones de anticuerpos anti-CDH3 desvelados pueden reconocer específicamente las células que expresan CDH3. Los paneles inferiores son fotografías que representan los resultados del análisis por RT-PCR semicuantitativo para el gen CDH3 en
10 líneas de células cancerosas.

[fig. 2A-B] La Figura 2A muestra la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* de ratones portadores de tumor después de la inyección de cada clon de anticuerpo marcado con Alexa 647. Los clones de anticuerpo marcados con fluorescencia se administran intravenosamente. Todas las imágenes de fluorescencia se adquirieron 3, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. La señal de fluorescencia de Alexa647 estaba pseudo-coloreada, que significa que rojo es alta
15 densidad. La Figura 2B muestra biodistribuciones de anticuerpos anti-CDH3 marcados con ^{111}In en ratones xenoinjertados con cáncer de pulmón humano EBC1, respectivamente (B: clon 1).

[fig. 2C-D] La Figura 2C-D muestra las biodistribuciones de anticuerpos anti-CDH3 marcados con ^{111}In en ratones xenoinjertados con cáncer de pulmón humano EBC1, respectivamente (C: clon 3, D: clon 4).

20 [fig. 2E-F] La Figura 2E-F muestra las biodistribuciones de anticuerpos anti-CDH3 marcados con ^{111}In en ratones xenoinjertados con cáncer de pulmón humano EBC1, respectivamente (E: clon 5, F: clon 6).

[fig. 3A-B] La Figura 3A-B muestra la biodistribución del anticuerpo clon nº 6 marcado con ^{111}In o anticuerpo de control. Los tumores injertados (A: EBC-1, B: SW948), hígado, riñón, intestinos, estómago, bazo, páncreas, pulmón, corazón, músculo y huesos se aíslan 48 horas después de la inyección, y se midieron las radiactividades. El recuadro negro muestra la acumulación de anticuerpo anti-CDH3 en cada tejido.

25 [fig. 3C-D] La Figura 3C-D muestra la biodistribución del anticuerpo clon nº 6 marcado con ^{111}In o anticuerpo de control. Los tumores injertados (C: KLM-1, D: H1373), hígado, riñón, intestinos, estómago, bazo, páncreas, pulmón, corazón, músculo y huesos se aíslan 48 horas después de la inyección, y se midieron las radiactividades. El recuadro negro muestra la acumulación de anticuerpo anti-CDH3 en cada tejido.

30 [fig. 3E] La Figura 3E muestra la biodistribución de anticuerpos nº 6 quiméricos o de ratón anti-CDH3 marcados con ^{111}In , o IgG humana normal o IgG1 de ratón como control. Los tumores injertados (H1373), hígado, riñón, intestinos, estómago, bazo, páncreas, pulmón, corazón, músculo y huesos se aíslan 48 horas después de la inyección, y se midieron las radiactividades. El recuadro negro muestra la acumulación de anticuerpo quimérico anti-CDH3 en cada tejido. El recuadro blanco muestra la acumulación de anticuerpo de ratón anti-CDH3 en cada tejido.

35 [fig. 4A-B] Las Figuras 4 muestran el efecto del anticuerpo anti-CDH3 marcado con ^{90}Y (clon nº 6) sobre el crecimiento tumoral. La Figura 4A muestra que la única administración de anticuerpo anti-CDH3 marcado con ^{90}Y (clon nº 6) suprime el crecimiento de células EBC-1 injertadas en ratones sin pelo. La Figura 4B muestra la tinción con HE del tejido tumoral después de la inyección. Como se muestra en los paneles derechos, el tejido tumoral sustituye el tejido de fibra teñido por la eosina (color rojo).

40 [fig. 5A-B] La Figura 5A muestra que la administración única del anticuerpo anti-CDH3 marcado con ^{90}Y (clon nº 6) suprime el crecimiento de células SW948 injertadas en ratones sin pelo. La Figura 5B muestra la fotografía de tumores en aspecto. Después de la inyección del anticuerpo anti-CDH3 marcado con ^{90}Y , el tumor se reduce aparentemente.

[fig. 6] La Figura 6 muestra que la administración única del anticuerpo anti-CDH3 marcado con ^{90}Y (clon nº 6) suprime el crecimiento de células KLM-1 injertadas en ratones sin pelo.

45 [fig. 7] La Figura 7 muestra que tanto la administración única como doble del anticuerpo anti-CDH3 marcado con ^{90}Y (clon nº 6) suprime el crecimiento de células SW948 injertadas en ratones sin pelo.

[fig. 8] La Figura 8 muestra que la administración única del anticuerpo quimérico anti-CDH3 marcado con ^{90}Y (quim nº 6) suprime el crecimiento de células KLM-1 injertadas en ratones sin pelo. CHX y SCN representan p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA y p-SCN-Bn-DTPA, respectivamente. Los anticuerpos se conjugan con estos quelantes bifuncionales para el radiomarcado con ^{90}Y .

50 **Descripción de realizaciones**

La invención se refiere a un anticuerpo anti-CDH3 o un fragmento del mismo como se define en las reivindicaciones y composiciones y a su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer. En una realización típica, el anticuerpo se marca con una etiqueta de radioisótopo. Se ha informado de micromatrices de ADNc para el análisis de expresión génica de células de cáncer pancreático y células normales recogidas de pacientes con cáncer pancreático (Nakamura y col., (2004) Oncogene; 23: 2385-400). Posteriormente se identificaron varios genes con expresión específicamente potenciada en células de cáncer pancreático. De estos genes con expresión alterada en células de cáncer pancreático, se seleccionó un gen, el gen de la cadherina placentaria (P-cadherina; CDH3) (Nº de acceso de GenBankNM_001793; SEC ID Nº 1, 2) que codifica proteína de la membrana citoplásmica con bajos niveles de expresión en órganos importantes, como el gen diana para terapias para el cáncer pancreático. Seleccionando genes con bajos niveles de expresión en órganos importantes, se evita el peligro de efectos secundarios. Además, se confirmó una expresión en exceso similar de CDH3 en otras líneas de células cancerosas, tales como las líneas celulares de cáncer de pulmón, colorrectal, de próstata, mama, gástrico e hígado (documento WO/2007/102525).

Definición

El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, pretende incluir inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivos para la proteína diseñada o péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados con otras proteínas o radiomarcas, y fragmentos de anticuerpos. Además, un anticuerpo en el presente documento se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada. Un “anticuerpo” indica todas las clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

“Fragmentos de anticuerpos” es una porción de un anticuerpo intacto, generalmente comprende la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Por consiguiente, en la presente invención, fragmento de anticuerpo puede comprender la porción de unión al antígeno del anticuerpo intacto. El término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo”), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos activos inmunológicos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CDH3). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos lineales; y moléculas de anticuerpo monocatenario. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido sintético o uno genéticamente manipulado que se une a un antígeno específico, tal como polipéptidos que consisten en la región variable de la cadena ligera, fragmentos “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas de polipéptido monocatenarias recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico (“proteínas scFv”), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.

Un experto en la materia entenderá que los anticuerpos que comprenden regiones variables (incluyendo regiones determinantes de la complementariedad) sustancialmente correspondientes a las secuencias de los anticuerpos de la invención pueden variar de la secuencia citada y todavía reconocer específicamente el mismo determinante antigénico. Esta variación de la secuencia puede establecerse en términos de un porcentaje de aminoácidos idénticos dentro de la secuencia. En algunas realizaciones, este porcentaje es de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %, por ejemplo, del 95, 96, 97, 98, 99 o del 100 %

Los términos “idénticas” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad con respecto a una región especificada, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia con respecto a una ventana de comparación o región designada) como se mide usando los algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos más adelante, o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, sitio web de NCBI en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ o similares). Se dice entonces que tales secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere a, o puede aplicarse a, el complemento de una secuencia de prueba. La definición también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, además de aquellas que tienen sustituciones. Como se describe más adelante, los algoritmos preferidos pueden explicar huecos y similares. Preferentemente, existe identidad con respecto a una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o más preferentemente con respecto a una región que tiene 50-100 aminoácidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si fuera necesario, y se designan

parámetros de programa del algoritmo de secuencias. Preferentemente, pueden usarse parámetros del programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa.

- 5 Una “ventana de comparación”, como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, normalmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias. Procedimientos de alineamiento de secuencias para comparación son muy conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds. 1987-2005, Wiley Interscience)).

- Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencias para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar análisis con BLAST está públicamente disponible a través del centro Nacional para Información Biotecnológica.

Producción de anticuerpos

La invención objeto usa anticuerpos para CDH3. Estos anticuerpos se proporcionarán por procedimientos conocidos.

- 25 Se describen técnicas a modo de ejemplo para la producción de los anticuerpos usados según la presente invención.

(i) Anticuerpos policlonales

- Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación por residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (por residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ en la que R' y R son grupos alquilo diferentes.

- Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 35 100 mcg o 5 mcg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado 40 del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de reticulación diferente.

También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. También se usan adecuadamente agentes agregantes tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

(ii) Anticuerpos monoclonales

- Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el adjetivo “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

- Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. nº 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster se inmuniza como se ha descrito anteriormente en este documento para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos

que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

- 5 Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.
- 10 Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia, EE. UU.
- 15 Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están cultivándose se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard descrito en Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

Otro procedimiento de generación de anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra CDH3 es cribar bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o porciones de los mismos, expresados en bacterias con una proteína o péptido CDH3. Por ejemplo, fragmentos completos Fab, regiones VH y regiones Fv pueden expresarse en bacterias usando bibliotecas de expresión en fago. Véanse, por ejemplo, Ward y col., *Nature* 341: 544-546 (1989); Huse y col., *Science* 246: 1275-1281 (1989); y McCafferty y col., *Nature* 348: 552-554 (1990). El cribado de tales bibliotecas con, por ejemplo, un péptido CDH3, puede identificar fragmentos de inmunoglobulina reactivos con CDH3. Alternativamente, puede usarse el ratón SCID-hu (disponible de Genpharm) para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos.

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadenas (Marks y col., *BioTechnology*, 10:779-783 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas

viales a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. nº 4.816.567; Morrison y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina.

Normalmente, tales polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos con los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos con los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Cualquier anticuerpo que se una al dominio extracelular de la proteína CDH3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 puede usarse para la invención. Por consiguiente, mientras que los anticuerpos reconozcan SEQ ID NO: 3, tales anticuerpos pueden usarse para un procedimiento, o composición de la presente invención. En realizaciones preferidas, los anticuerpos que reconocen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 pueden unirse a células que expresan CDH3 que comprenden al menos dominios transmembrana y extracelulares de los mismos.

Mientras tanto, la invención también proporciona un anticuerpo adecuado para tratar o diagnosticar enfermedad asociada a CDH3. En particular, el anticuerpo definido con las siguientes propiedades es preferible para tal uso como fin.

Los dominios VH y VL de anticuerpos de la invención incluyen cada uno tres CDR designadas CDR1, CDR2 y CDR3, separadas por regiones estructurales. Las secuencias de aminoácidos de las CDR no están particularmente limitadas, mientras que el anticuerpo pueda unirse específicamente a CDH3. Ejemplos de secuencias de aminoácidos CDR preferidas incluyen, pero no se limitan a:

CDR1 de VH: **SYWIIH** (SEQ ID NO: 13),

CDR2 de VH: **EIDPSDNYTTYYNQNFKG** (SEQ ID NO: 14),

CDR3 de VH: **SGYGNLFVY** (SEQ ID NO: 15),

CDR1 de VL: **SATSSVTYMY** (SEQ ID NO: 16),

CDR2 de VL: **RTSNLAS** (SEQ ID NO: 17), y

CDR3 de VL: **QHYYHIYPRT** (SEQ ID NO: 18)

Uno de los procedimientos predictivos de CDR se describe en Kabat E. A. y col. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest. 5ª edición. Publicación de NIH nº 91-3242.

En una realización más preferida, VH se corresponde con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y VL se corresponde con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Según la presente invención, los anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión de los mismos pueden caracterizarse como:

i) anticuerpo que comprende regiones variables definidas por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12;

ii) anticuerpos que pueden unirse al mismo determinante antigénico que el anticuerpo monoclonal definido por las secuencias de aminoácidos de las CDR descritas aquí;

iii) fragmentos de unión de los anticuerpos monoclonales definidos por las secuencias de aminoácidos; o

iv) fragmentos de unión de un anticuerpo monoclonal que pueden unirse al mismo determinante antigénico que el anticuerpo monoclonal definido por las secuencias de aminoácidos.

Las técnicas convencionales de biología molecular pueden usarse para preparar secuencias de ADN que codifican los productos quiméricos e injertados en CDR. Genes que codifica las CDR de un anticuerpo de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para sintetizar la región variable del ARN de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick y col., "Methods: a Companion to Methods in Enzymology", vol. 2: página 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application; Ritter y col. (eds.), página 166 (Cambridge University Press, 1995) y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications;

Birch y col. (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc., 1995)). Las secuencias de ADN que codifican los productos químicos e injertados en CDR pueden sintetizarse completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Pueden usarse las técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y de reacción en cadena de la polimerasa según convenga. Por ejemplo, puede usarse la síntesis dirigida a oligonucleótidos como se describe por Jones y col., (1986) *Nature*; 321:522-5.

5 También puede usarse mutagénesis dirigida a oligonucleótidos de una región variable preexistente como se describe, por ejemplo, por Verhoeyen y col., (1988) *Science*; 239:1534-6 o Riechmann y col., (arriba). También puede usarse el llenado enzimático de oligonucleótidos con huecos usando ADN polimerasa T4 como se describe, por ejemplo, por Queen y col., (1989) *Proc Natl Acad Sci USA*; 86:10029-33; publicación PCT WO 90/07861.

Puede usarse cualquier célula huésped adecuada/sistema de vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras injertadas en CDR. Pueden usarse sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos, en particular para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos FAb y (Fab')₂, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenarios. Pueden usarse sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo, de mamífero, en particular, para la producción de mayores productos de anticuerpo injertados en CDR, que incluyen moléculas de anticuerpo completas.

10 Células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO y líneas de células de mieloma o de hibridoma.

(iii) Anticuerpos humanizados

Se han descrito en la técnica procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)] sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químicos (patente de EE. UU. n° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

20

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la producción de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Suns y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chotia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

30

Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el antígeno diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión al antígeno.

40

45

(iv) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones químicos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes en la línea germinal

50

55

producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno. 7: 33 (1993); y las patentes de EE. UU. nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Alternativamente, puede usarse tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como secundaria de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La expresión en fago puede realizarse en una variedad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago.

Clackson y col., Nature 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes de V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos para una diversa matriz de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE. UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

También pueden generarse anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. 5.567.610 y 5.229.275). Un medio preferido de generación de anticuerpos humanos usando ratones SCID se desvela en solicitudes de patente en tramitación junto con la presente del mismo solicitante.

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan y col., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; patente de EE. UU. nº 5.571.894; y patente de EE. UU. nº 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. nº 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. A modo de ejemplo, un brazo de unión al marcador de células contra el cáncer puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera que concentren los mecanismos de defensa celular en la célula cancerosa. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en la célula cancerosa. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al marcador de células cancerosas y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Se conocen en la técnica procedimientos de producción de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y col., Nature 305: 537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante difícil, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Trautner y col., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos, o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Según otro enfoque descrito en la patente de EE. UU. n° 5.731.168, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE. UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Pueden producirse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE. UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan y col., *Science* 229: 81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina (Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de la bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:

6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Conjugados de anticuerpo y otras modificaciones

Los anticuerpos usados en los procedimientos o incluidos en los artículos de fabricación en el presente documento están opcionalmente conjugados con un agente citotóxico o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico incluye cualquier agente quimioterapéutico que es útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK@ razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en este agente terapéutico agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

En el presente documento también se contemplan conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (patente de EE. UU. nº 5.208.020), un tricoteceno y CC 1065. En una realización preferida de la invención, los anticuerpos están conjugados con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede convertirse, por ejemplo, en May-SS-Me, que puede reducirse a May-SH3 y reaccionar con anticuerpos modificados (Chari y col., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para generar un conjugado de maitansinoide-anticuerpo.

Alternativamente, el anticuerpo puede conjugarse con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, gamma11, alfa21, alfa31, N-acetil-gamma11, PSAG y O11 (Hinman y col., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode y col., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)).

Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado del 28 de octubre de 1993.

La invención contempla además anticuerpo conjugado con una variedad de isótopos radiactivos. Ejemplos incluyen ^{111}In , ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P e isótopos radiactivos de Lu. En la presente invención, el anticuerpo de la presente invención puede marcarse con radionúclidos justo antes de uso, o proporcionarse como anticuerpo radiomarcado. El médico habitual se dará cuenta de que hay numerosos radionúclidos y agentes quimioterápicos que pueden acoplarse a anticuerpos específicos de tumor por técnicas muy conocidas y administrarse a un sitio para dañar específicamente células tumorales y tejido (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 4.542.225 de W. A. Blattler y col., concedida el 17 de septiembre de 1985; y Pastan y col., 1986, Cell, 47:641-648). Por ejemplo, reactivos de obtención de imágenes y citotóxicos que son adecuados para su uso incluyen ^{125}I , ^{123}I , ^{111}In (por ejemplo, Sumerdon y col., 1990, Nucl. Med. Biol., 17:247-254) y $^{99\text{m}}\text{Tc}$; marcas fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina; marcas quimioluminiscentes tales como luciferina, e iones paramagnéticos para su uso en imagen por resonancia magnética (Lauffer y col., 1991, Magnetic Resonance in Medicine, 22:339-342). Los anticuerpos pueden marcarse con tales reactivos usando protocolos y técnicas conocidos y puestos en práctica en la materia. Véanse, por ejemplo, Wenzel y Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, Nueva York, 1983; Colcer y col., 1986, Meth. Enzymol., 121:802-816; y Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Eds. Baldwin y col., Academic Press, 1985, pág. 303-316, para técnicas referentes al radiomarcado de anticuerpos. Se han descrito anticuerpos monoclonales marcados con itrio-90 (^{90}Y) para maximizar la dosis administrada al tumor o células cancerosas y/o tejido, mientras que se limita la toxicidad a tejidos normales (por ejemplo, Goodwin y Meares, 1997, Cancer Supplement, 80:2675-2680). También pueden usarse otros radionúclidos citotóxicos que incluyen, pero no se limitan a, yodo-131 (^{131}I) y renio-186 para marcar anticuerpos monoclonales de la presente invención. Entre los radionúclidos, el itrio-90 (^{90}Y) puede ser adecuado para radioinmunoterapia, ya que el itrio-90 (^{90}Y) proporciona ventajas con respecto al yodo-131 (^{131}I) debido a que libera mayor energía beta (2,3 MeV frente a 0,61 MeV) al tumor y tiene una longitud de paso de 5 a 10 mm, produciendo la capacidad mejorada de destruir tanto células elegidas como diana como vecinas, una ventaja particularmente en tumor voluminoso o poco vascularizado. La marca detectable/de detección usada está seleccionada según la modalidad de obtención de imágenes que vaya a usarse. Por ejemplo, pueden usarse marcas radiactivas, tales como indio-111 (^{111}In), tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) o yodo-131 (^{131}I), para barridos planos o para tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Por tanto, pueden usarse marcas emisoras de positrones tales como flúor-19 en tomografía de emisión de positrones (PET). Pueden usarse iones paramagnéticos, tales como gadolinio (III) o manganeso (II), en imagen por resonancia magnética (IRM). Los anticuerpos monoclonales también pueden marcarse con marcas radiopacas para la visualización de células cancerosas después de la inyección, por ejemplo, por rayos X, CATscan o IRM. En particular, para enfermedad relacionada con CDH3 (por ejemplo, cánceres), la localización de la marca dentro de los cánceres permite la determinación de la diseminación de la enfermedad. La cantidad de marca que está presente y detectable dentro de los cánceres que expresan CDH3 permite, por ejemplo, la determinación de la presencia o ausencia de cáncer o tumor en el sujeto que va a diagnosticarse.

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidilo (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo-HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato), compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta y col., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiarnapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo (véase el documento WO94/11026). El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil de ácido, conector sensible de peptidasa, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Charm y col., Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Los anticuerpos de la invención también puede conjugarse con una enzima activadora de profármaco que convierte un

profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco antineoplásico activo (véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE. UU. n° 4.975.278).

El componente de enzima de tales conjugados incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

- 5 Enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos
10 libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como 13-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; 13-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con 13-lactamas en fármacos libres y penicilina amidasas tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres.
15 Alternativamente, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describen en el presente documento para administrar la abzima a una población de células tumorales.

- 20 Las enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente al anticuerpo por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales anteriormente tratados. Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984)).

- 25 Otras modificaciones del anticuerpo se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

- Los anticuerpos desvelados en el presente documento también pueden formularse como liposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); las patentes
30 de EE. UU. n° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la patente de EE. UU. n° 5.013.556.

- Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido dando liposomas con el diámetro deseado. Los
35 fragmentos Fab' de un anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma (véase Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)).

- 40 Se contemplan modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción
45 final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glucosilación.

- Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados
50 tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no
55 necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza barrido

de ala o mutagénesis al azar en el codón o región diana y las variantes de anticuerpo expresadas se criban para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones intrasecuencia de un único residuo de aminoácido o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo con una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución del anticuerpo incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR.

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

Los residuos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. En cambio, pueden añadirse enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente si el anticuerpo es un fragmento tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se expresan en un modo monovalente en partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto del gen III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se ha desvelado en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación puede realizarse mutagénesis por barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se indica delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de polipéptidos está normalmente tanto ligada a N como ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-

serina y asparagina-X-treonina en las que X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina.

Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, el más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante preparada anteriormente o una versión de no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable modificar los anticuerpos usados en la invención para mejorar la función efectora, por ejemplo, de manera que se potencie la citotoxicidad mediada por células dependiente del antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo. Alternativamente o además, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o elevada destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véanse Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992).

También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando reticulantes heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente puede manipularse un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y así puede tener lisis del complemento potenciada y capacidades de ADCC (véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, puede incorporarse un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.739.277. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Diagnóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3 o de una predisposición a desarrollar la enfermedad

Puede usarse un anticuerpo anti-CDH3 de la invención como marcador para el diagnóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3.

Más específicamente, detectando la proteína CDH3 con un anticuerpo anti-CDH3 de la presente invención en una muestra, puede diagnosticarse una enfermedad que está asociada a CDH3. Así, la invención proporciona procedimientos para el diagnóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3 o una predisposición a desarrollar una enfermedad que está asociada a CDH3 en un sujeto detectando la proteína CDH3 con un anticuerpo anti-CDH3 de la presente invención en el sujeto. Los procedimientos comprenden las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con el anticuerpo o fragmento de la invención;
- (b) detectar la proteína CDH3 en la muestra o espécimen; y
- (c) juzgar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar la enfermedad basándose en la abundancia relativa de la proteína CDH3 en comparación con un control.

En una realización típica, una enfermedad que está asociada a CDH3 es cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado.

Alternativamente, en otras realizaciones, el anticuerpo anti-CDH3 de la invención puede usarse para detectar u obtener imágenes un cáncer en un cuerpo vivo. Más específicamente, la presente invención proporciona procedimientos para detectar u obtener imágenes de un cáncer que comprenden las etapas de:

- (1) administrar a un sujeto un anticuerpo anti-CDH3 o fragmento de unión del mismo;

(2) detectar la acumulación o localización del anticuerpo en un cuerpo vivo, y

(3) determinar la localización del anticuerpo o fragmento de unión del mismo, dentro del paciente

Alternativamente, según la invención, pueden detectarse células cancerosas o tejidos en un paciente. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos para detectar un cáncer, en el que CDH3 se expresa en tejido tumoral en un paciente, que comprende: administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo al sujeto que permite que el anticuerpo o fragmento del anticuerpo se una específicamente a CDH3 en las células o tejido; visualizar el anticuerpo unido en las células o tejido; y comparar niveles de anticuerpo unido en las células o tejido con células o tejido de control normal, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo unido a las células o tejido del paciente con respecto a las células o tejido de control normal es indicativo de un cáncer en el paciente

10 Preferentemente, con el fin de seguir el anticuerpo administrado en un cuerpo vivo, el anticuerpo puede marcarse con moléculas detectables. Por ejemplo, el comportamiento de anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente, sustancia luminiscente o radioisótopo puede seguirse *in vivo*. Procedimientos para marcar un anticuerpo con tales moléculas son muy conocidos en la técnica.

15 Los anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente pueden observarse, por ejemplo, usando un endoscopio o un laparoscopio. Si se usa un radioisótopo, pueden obtenerse imágenes de la localización de un anticuerpo siguiendo la radiactividad del radioisótopo. En la presente invención, la localización de un anticuerpo anti-CDH3 *in vivo* demuestra la presencia de células cancerosas.

20 Alternativamente, un anticuerpo anti-CDH3 de la invención puede usarse para la obtención de imágenes *in vivo*. Específicamente, un anticuerpo anti-CDH3 de la invención marcado para la detección puede usarse con el fin de visualizar la proteína CDH3 en un cuerpo vivo. Por ejemplo, el comportamiento de anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente, sustancia luminiscente o radioisótopo puede seguirse *in vivo*. Anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente pueden observarse usando un sistema de obtención de imágenes biológicas. Si se usa un radioisótopo, pueden obtenerse imágenes de la localización de un anticuerpo por inmunoescintigrafía.

25 Otra realización de la invención proporciona diagnósticos, procedimientos de diagnóstico y procedimientos de obtención de imágenes para cánceres y tumores que expresan CDH3 usando los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de la invención. Los usos de diagnóstico del anticuerpo de la presente invención engloban tumores primarios y cánceres, además de metástasis. En realizaciones preferidas, los cánceres que expresan CDH3 pueden seleccionarse del grupo que consiste en cánceres pancreáticos, de pulmón, colon, próstata, mama, gástricos o de hígado.

30 Un procedimiento de diagnóstico según la invención comprende administrar, introducir o infundir el anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión como se describe en el presente documento, con o sin conjugación con un resto detectable, tal como un radioisótopo. Tras la administración o infusión, el anticuerpo o fragmento de unión se une al tumor o células cancerosas, después de lo cual se detecta la localización de los anticuerpos unidos o fragmentos. Para anticuerpos detectablemente marcados o fragmentos, por ejemplo, aquellos marcados con un radioisótopo, puede usarse instrumentación de obtención de imágenes para identificar la localización del agente dentro del cuerpo. Para anticuerpos no marcados o fragmentos, puede administrarse un segundo reactivo detectable, que localiza los anticuerpos unidos o fragmentos de manera que puedan detectarse adecuadamente. Se han empleado procedimientos similares para otros anticuerpos, y el médico habitual conocerá diversos procedimientos adecuados para obtener imágenes de la localización del anticuerpo detectablemente unido o fragmentos dentro del cuerpo. Como una guía no limitante, se administran aproximadamente 10-1000 microgramos (mcg), preferentemente aproximadamente 50-500 mcg, más preferentemente aproximadamente 100-300 mcg, más preferentemente aproximadamente 200-300 mcg de anticuerpo purificado. Por ejemplo, dosis aplicables para seres humanos incluyen aproximadamente 100-200 mcg/kg de peso corporal, o 350-700 mg/m² de área superficial del cuerpo.

45 Según la invención, puede proporcionarse un resultado intermedio para examinar la afección de un sujeto. Tal resultado intermedio puede combinarse con información adicional para ayudar a un doctor, enfermera u otro médico a determinar si un sujeto padece una enfermedad que está asociada a CDH3. Alternativamente, la invención puede usarse para detectar células cancerosas en un tejido derivado de sujeto, y proporcionar a un doctor información útil para determinar si el sujeto padece cánceres pancreáticos, de pulmón, colon, próstata, mama, gástricos o de hígado.

Monitorización y pronóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3

Evaluación de la eficacia del tratamiento:

50 El gen CDH3 diferencialmente expresado también permite monitorizar y evaluar el transcurso de tratamientos para una enfermedad que está asociada a CDH3, por ejemplo, células de cáncer pancreático (células PaC), células de cáncer de pulmón (células LuC), células de cáncer de colon (células CC), células de cáncer de próstata (por ejemplo, células PrC), células de cáncer de mama (células BC), células de cáncer gástrico (células GC), o células de cáncer de hígado (células

LiC). Alternativamente, según la invención, puede proporcionarse un resultado intermedio para monitorizar el transcurso del tratamiento de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC. Tales resultados intermedios pueden combinarse con información adicional para ayudar a un doctor, enfermera u otro médico a determinar si un sujeto padece cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado. Por tanto, el gen o proteína CDH3 así codificado es un marcador de pronóstico útil para monitorizar el desenlace clínico de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC. Alternativamente, la presente invención puede usarse para detectar células cancerosas en un tejido derivado de sujeto, y proporcionar a un doctor información útil para evaluar el transcurso del tratamiento de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC. En este procedimiento, se proporciona una población de células de prueba de un sujeto que está recibiendo tratamiento para PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC. Si se desea, las poblaciones de células de prueba se obtienen del sujeto en diversos momentos de tiempo, antes, durante y/o después del tratamiento. Entonces, se determina la expresión del gen CDH3 en la población de células de prueba y se compara con la expresión de los mismos genes en una población de células de referencia que incluye células cuyo estado de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC es conocido. En el contexto de la invención, las células de referencia no deben haberse expuesto al tratamiento de interés.

En el contexto de monitorizar y evaluar un transcurso particular del tratamiento para PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC, la muestra biológica debe derivarse de un sujeto que está recibiendo tratamiento para cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado. Preferentemente, se obtienen múltiples muestras biológicas de prueba del sujeto en diversos momentos de tiempo antes, durante o después del tratamiento.

Si la población de células de referencia contiene células no de PaC, células no de LuC, células no de CC, células no de PrC, células no de BC, células no de GC o células no de LiC, una similitud en la expresión del gen CDH3 en la población de células de prueba y la población de células de referencia indica que el tratamiento de interés es eficaz. Sin embargo, una diferencia en la expresión del gen CDH3 en la población de células de prueba y una población de células de referencia de control normal indica un desenlace clínico o pronóstico menos favorable. Similarmente, si la población de células de referencia contiene células PaC, células LuC, células CC, células PrC, células BC, células GC o células LiC, una diferencia entre la expresión del gen CDH3 en la población de células de prueba y la población de células de referencia indica que el tratamiento de interés es eficaz, mientras que una similitud en la expresión del gen CDH3 en la población de prueba y una población de células de referencia de control de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC indica un desenlace clínico o pronóstico menos favorable.

Adicionalmente, el nivel de expresión del gen CDH3 determinado en una muestra biológica de un sujeto obtenido después del tratamiento (es decir, niveles después del tratamiento) puede compararse con el nivel de expresión del gen CDH3 determinado en una muestra biológica de un sujeto obtenida antes de la aparición del tratamiento (es decir, niveles antes del tratamiento). Una disminución en el nivel de expresión en una muestra después del tratamiento indica que el tratamiento de interés es eficaz, mientras que un aumento o mantenimiento en el nivel de expresión en la muestra después del tratamiento indica un desenlace clínico o pronóstico menos favorable.

Como se usa en el presente documento, el término "eficaz" indica que el tratamiento conduce a una reducción en la expresión de gen CDH3 o una disminución en el tamaño, prevalencia o potencial metastásico de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC en un sujeto. Cuando se aplica un tratamiento de interés profilácticamente, el término "eficaz" significa que el tratamiento retarda o previene que se forme un cáncer de pulmón y/o un tumor esofágico o retarda, previene o alivia un síntoma de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC clínicas. La evaluación de tumores pancreáticos, de pulmón, colon, próstata, mama, gástricos o de hígado puede hacerse usando protocolos clínicos estándar.

Además, la eficacia puede determinarse en asociación con cualquier procedimiento conocido para el diagnóstico o tratamiento de PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC. Pueden diagnosticarse PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC, por ejemplo, histopatológicamente, o alternativamente identificando anomalías sintomáticas, por ejemplo, pérdida de peso, pérdida de apetito, dolor abdominal, dolor de espalda, anorexia, náuseas, vómitos y malestar general, debilidad e ictericia.

Evaluación del pronóstico de un sujeto con una enfermedad que está asociada a CDH3:

La invención también proporciona procedimientos para evaluar el pronóstico de un sujeto con una enfermedad que está asociada a CDH3, por ejemplo, PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC, incluyendo tales procedimientos la etapa de comparar la expresión del gen CDH3 en una población de células de prueba con la expresión del gen CDH3 en una población de células de referencia de pacientes con respecto a un espectro de etapas de enfermedad. Comparando la expresión génica del gen CDH3 en la población de células de prueba y la(s) población (poblaciones) de células de referencia, o comparando el patrón de expresión génica con el tiempo en poblaciones de células de prueba del sujeto, puede evaluarse el pronóstico del sujeto.

Alternativamente, según la invención, puede proporcionarse un resultado intermedio para evaluar el pronóstico de un sujeto con PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC. Tal resultado intermedio puede combinarse con información adicional para ayudar a un doctor, enfermera u otro médico a determinar si un sujeto padece cáncer de pulmón o cáncer esofágico. Alternativamente, la invención puede usarse para detectar células cancerosas en un tejido derivado de sujeto, y

proporcionar a un doctor información útil para evaluar el pronóstico de un sujeto con PaC, LuC, CC, PrC, BC, GC o LiC.

Por ejemplo, un aumento en la expresión del gen CDH3 en una muestra de prueba en comparación con una muestra de control normal indica un pronóstico menos favorable. En cambio, una similitud en la expresión del gen CDH3, en una muestra de prueba en comparación con muestra de control normal, indica un pronóstico más favorable para el sujeto.

5 Kits y reactivos para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento de una enfermedad asociada a CDH3:

La invención proporciona un kit para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada a CDH3. Específicamente, el kit incluye un reactivo para detectar la proteína CDH3. Reactivos adecuados para detectar la proteína CDH3 incluyen un anticuerpo para la proteína CDH3. Preferentemente, con el fin de seguir el anticuerpo administrado en un cuerpo vivo, el anticuerpo puede marcarse con moléculas detectables. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con sustancia fluorescente, sustancia luminiscente o radioisótopo. Procedimientos para marcar anticuerpos y detectar los anticuerpos marcados son muy conocidos en la técnica y puede emplearse cualquier marca y procedimiento para la invención.

Además, el kit puede incluir reactivos de control positivo y negativo, y un anticuerpo secundario para detectar un anticuerpo contra la proteína CDH3. Por ejemplo, muestras de tejido obtenidas de sujetos con buen pronóstico o mal pronóstico pueden servir de reactivos de control útiles. Un kit de la invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos (por ejemplo, escritos, cinta, CD-ROM, etc.) con instrucciones para su uso. Estos reactivos y tales pueden ser retenidos en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En otras realizaciones, la invención proporciona además un kit para su uso en detectar, obtener imágenes o tratar un cáncer dentro de un sujeto que va a diagnosticarse que comprende el anticuerpo contra la proteína CDH3. En realizaciones preferibles, el anticuerpo de la invención puede marcarse con un radioisótopo. Por ejemplo, el kit de la invención puede contener un anticuerpo que reconoce CDH3 modificado con agente quelante y sustancia radiactiva. MX-DOPA es un agente quelante preferible para modificar el anticuerpo. Mientras tanto, puede usarse indio-111 (^{111}In) como trazador para la obtención de imágenes biológicas. Alternativamente, con el fin de radioinmunoterapia de un cáncer que expresa CDH3, el anticuerpo puede marcarse con beta-núclidos, por ejemplo, itrio-90 (^{90}Y). En la presente invención, también pueden proporcionarse indio-111 (^{111}In) o itrio-90 (^{90}Y) como sal o disolución de la misma. Una sal adecuada de indio-111 (^{111}In) o itrio-90 (^{90}Y) es el cloruro.

En una realización preferible, una enfermedad asociada a CDH3 es cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado.

30 Usos terapéuticos

A continuación se describen composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer usando el anticuerpo de la invención. El cáncer incluye, pero no se limita a, una célula de cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado.

El término "sujeto" en el presente documento se refiere a un sujeto que ha padecido cáncer que incluye, pero no se limita a, una célula de cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado. El sujeto en el presente documento puede ser animales que incluyen mamíferos y animales aviares. Por ejemplo, los mamíferos pueden incluir seres humanos, ratones, ratas, monos, conejos y perros.

El anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento puede unirse específicamente a la proteína CDH3, de manera que cuando el anticuerpo o fragmento del mismo vaya a administrarse a un sujeto, se una a la proteína CDH3 en el sujeto y pueda suprimirse el crecimiento de las células que expresan CDH3. Alternativamente, si el anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico y administrarse a un sujeto, se administra a una región que expresa la proteína CDH3 (es decir, región sufriendo) en un sujeto y el resto terapéutico puede administrarse selectivamente a la región sufriendo y actuar sobre ella. Tal resto terapéutico puede ser cualquier terapéutico que sea conocido o se desarrolle por tener una eficacia terapéutica sobre el cáncer e incluye, pero no se limita a, una etiqueta de radioisótopo y agente quimioterapéutico. Una etiqueta de radioisótopo que puede usarse como terapéutico puede seleccionarse dependiendo de una variedad de elementos que incluyen energía de rayos beta y su eficiencia de emisión, la presencia o ausencia de rayo gamma emitido, su energía y eficiencia de emisión, semivida física y procedimiento de marcado. Generalmente, puede usarse la etiqueta de radioisótopo basado en itrio (tal como ^{90}Y) y yodo (tal como ^{125}I y ^{131}I). Un agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente que sea conocido o se desarrollará para tratar el cáncer e incluye, pero no se limita a, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, cisplatino, carboplatino, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel. El anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento puede unirse selectivamente a la proteína CDH3 y no se une a una célula normal, de manera que el efecto secundario que se produce por el anticuerpo o fragmento del mismo, o radioisótopo o agente quimioterapéutico, puede evitarse eficazmente y, por tanto, la potencia

terapéutica puede ser alta.

El anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento puede administrarse a un sujeto a dosis eficaces para tratar o prevenir la enfermedad asociada a CDH3. Una dosis eficaz se refiere a aquella cantidad de un anticuerpo o un fragmento del mismo suficiente para producir un beneficio saludable en el sujeto tratado. Formulaciones y procedimientos de administración que pueden emplearse cuando la composición farmacéutica contiene un anticuerpo de la invención se describen más adelante.

Debe entenderse adicionalmente que una mezcla de diferentes anticuerpos monoclonales, tal como una mezcla de los anticuerpos monoclonales específicos descritos en el presente documento o sus fragmentos de unión, puede administrarse, si fuera necesario o se deseara, para aliviar cánceres. De hecho, el usar una mezcla de anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión de los mismos, en una mezcla para elegir como diana varios antígenos, o diferentes epítopes, sobre células cancerosas, es un enfoque ventajoso, particularmente para prevenir la evasión de células tumorales y/o células cancerosas debido a la regulación por disminución de uno de los antígenos.

Composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) mediante inyección, mediante, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el anticuerpo puede estar en forma de polvo liofilizado para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

La toxicidad y eficacia terapéutica del anticuerpo o fragmento, o el resto terapéutico conjugado con el mismo, puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL/DE.

Se prefieren anticuerpos o restos terapéuticos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse anticuerpos o restos que presentan efectos secundarios tóxicos, deberá tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija tales anticuerpos o restos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y así reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de tales anticuerpos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada y los tipos y las cantidades del resto terapéutico conjugado. Para cualquier anticuerpo usado en el procedimiento de la invención, la dosis eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la CI50 (es decir, la concentración del anticuerpo de prueba que logra una inhibición al 50 % de síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Aunque dependiendo de las condiciones y edad del sujeto y/o vía de administración, un experto en la materia puede seleccionar una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la invención. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la invención va a administrarse en una cantidad tal que el anticuerpo según la presente invención vaya a administrarse al sujeto en un día en una cantidad de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 mcg por kg de peso corporal de sujeto, y preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mcg por kg de peso corporal de sujeto. El intervalo de administración y los tiempos pueden seleccionarse en vista de la condición y edad del sujeto, vía de administración y respuesta a la composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse al sujeto de una a 5 veces, preferentemente 1 vez al día durante 5 a 10 días.

En otro aspecto, si la composición que comprende el anticuerpo marcado con radioisótopo va a administrarse parenteralmente, la dosis administrada para un único adulto es 0,1 mCi/kg a 1,0 mCi/kg, preferentemente 0,1 mCi/kg a 0,5 mCi/kg, y más preferentemente 0,4 mCi/kg de una vez.

La composición farmacéutica puede administrarse sistémicamente o localmente. Debe administrarse preferentemente en un modo de administración dirigida de manera que se administre el componente activo a un sitio afectado.

En realizaciones particulares, las composiciones de la invención se usan para el tratamiento o prevención del cáncer junto con uno o una combinación de agentes quimioterapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, cisplatino, carboplatino, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel.

5 Con respecto a la radioterapia, puede usarse cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del tipo del cáncer que vaya a tratarse. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, puede administrarse radiación de rayos X. También pueden administrarse radioisótopos emisores de rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos para exponer tejidos.

10 En otra realización, va a administrarse quimioterapia o radioterapia, preferentemente al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, y más preferentemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses) tras usar los procedimientos y composiciones que contienen el anticuerpo de la presente invención. La quimioterapia o radioterapia va a administrarse antes de, simultáneamente con o tras el tratamiento usando las composiciones según la invención pueden administrarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica.

15 En otra realización, la invención también proporciona el uso del anticuerpo de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad asociada a CDH3. En particular, la invención proporciona además un uso de anticuerpo radiomarcado de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer.

20 Alternativamente, la invención proporciona además el anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a CDH3. En particular, también se proporciona el anticuerpo radiomarcado de la presente invención para su uso en radioinmunoterapia para el cáncer.

25 Alternativamente, la invención proporciona además un procedimiento o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a CDH3, en el que el procedimiento o proceso comprende la etapa de formular un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con el anticuerpo de la invención como principios activos. En particular, la invención proporciona además un procedimiento o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer, en el que el procedimiento o proceso comprende la etapa de formular un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con el anticuerpo radiomarcado de la presente invención como principios activos.

30 En otra realización, la invención también proporciona un procedimiento o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a CDH3, en el que el procedimiento o proceso comprende la etapa de mezclar un principio activo con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, en el que el principio activo es el anticuerpo de la invención. En particular, la invención proporciona además un procedimiento o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer, en el que el procedimiento o proceso comprende la etapa de mezclar el anticuerpo radiomarcado de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

35 En otra realización, la invención proporciona el anticuerpo de la invención para su uso en la obtención de imágenes biológicas o inmunoescintigrafía para el cáncer dentro de un sujeto que va a diagnosticarse. Alternativamente, la invención proporciona el uso del anticuerpo de la invención para la fabricación de un agente de diagnóstico para la obtención de imágenes biológicas o inmunoescintigrafía para el cáncer dentro de un sujeto. La invención proporciona además un procedimiento o proceso para la fabricación de un agente de diagnóstico para la obtención de imágenes biológicas o inmunoescintigrafía para el cáncer dentro de un sujeto, en el que el procedimiento o proceso comprende la etapa de mezclar el anticuerpo de la invención con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se explica adicionalmente basándose en ejemplos.

Materiales y procedimientos

45 Producción de anticuerpos.

50 Se amplificó el dominio extracelular codificado por el gen CDH3 (SEQ ID NO: 3) del conjunto de ADNc derivado de células cancerosas. El producto se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen, CA). Para producir anticuerpo específico para CDH3, los ratones se inmunizaron subcutáneamente con el vector de expresión del dominio (17,5 mcg/inyección) cada dos semanas durante un mes. Después de la confirmación del título de antisueros, se extrajeron esplenocitos de los ratones y se fusionaron con células de mieloma para preparar hibridomas. Los presentes inventores cribaron los hibridomas que pueden reconocer antígeno CDH3 nativo sobre la superficie de las células cancerosas. Mediante el cribado, se reveló que el clon nº 6 del hibridoma produjo anticuerpo específico de antígeno a alto nivel, por tanto se seleccionó este clon para

producir anticuerpo para experimentos adicionales. El clon nº 6 del hibridoma se usó para inyectarlo intraperitonealmente en ratones. Se recuperó ascitis después de 2 a 3 semanas. Finalmente, el anticuerpo se purificó de la ascitis usando columna de proteína A (GE Healthcare, NJ).

Cultivo celular.

- 5 Se usaron seis líneas de células cancerosas: EBC-1, H1373 y H358 como línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas; KLM-1 y MIAPaCa-2 como línea de cáncer pancreático; SW948 como línea de cáncer colorrectal. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) y se mantuvieron en EMEM (EBC-1, MIAPaCa-2), RPMI (H358, KLM-1, H1373) y L-15 (SW948) complementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) y 1 % de penicilina/estreptomicina a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂.

10 Citómetro de flujo.

Se mantuvieron H358, KLM-1 y MIAPaCa-2 en cada medio de cultivo recomendado hasta la confluencia temprana. Las células se disociaron posteriormente con disolución de disociación de células (SIGMA, MO) para evitar desnaturalizar el antígeno de la superficie celular. Se suspendieron células con PBS (1 x 10⁷ células/ml) y se incubaron con anticuerpo de prueba (50 mcg/ml) durante 1 h a 4 °C. Después de lavar dos veces con PBS, las células se mezclaron con 20 mcg/ml de Alexa Fluor488-anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) (Invitrogen, CA) que contenía 7AAD (2,5 mcg/ml) y se incubaron durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. Se evaluó el modo de unión y la especificidad del anticuerpo de prueba por FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ) según instrucción del fabricante.

Radiomarcado.

- 20 Se marcaron anticuerpo monoclonal de ratón anti-CDH3 producido por clon nº 6 de hibridoma (clon 6), el anticuerpo quimérico del clon 6 (quim nº 6) producido por 293T y anticuerpos de control, IgG1 de ratón normal (Nordic immunological laboratories, Tiburg, Los Países Bajos) y IgG humana normal con dos isótopos diferentes; indio-111 (¹¹¹In) e itrio-90 (⁹⁰Y). El anticuerpo se marcó con ¹¹¹In y ⁹⁰Y mediante un agente quelante de ión metálico bifuncional, p-SCN-Bn-DTPA o p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA (Macrocyclics, Dallas, TX, EE. UU.). Se conjugó un miligramo de anticuerpo con estos quelantes en dimetilformamida a una relación molar de 1:5. Después de la incubación a 37 °C durante 20 h, los complejos de anticuerpo-quelante se purificaron usando la columna Biospin 6 (Bio-Rad, Tokio, Japón). Se incubaron respectivamente ¹¹¹InCl₃ (Nihon Medi-Physics, Hyogo, Japón) y ⁹⁰YCl₃ (QSA Global, Braunschweig, Alemania) con ácido acético 0,25 M (pH 5,5) durante 5 minutos a temperatura ambiente en paralelo. Para obtener anticuerpos marcados con ¹¹¹In y ⁹⁰Y, los complejos de anticuerpo-quelante se incubaron con la disolución de ¹¹¹InCl₃ y ⁹⁰YCl₃ preincubada, respectivamente, durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo marcado se purificó usando la columna Biospin 6 según instrucciones del fabricante. Se confirmó que la degradación de estos anticuerpos no se observó durante los procesos de marcado.

Modelos de xenoinjerto.

- 35 Se realizó cuidado y tratamiento animal según las pautas de uso de animales y el comité animal de la Universidad de Gunma. Se inocularon 100 mcl de suspensión de células EBC1, SW948, KLM-1 y H1373 (1 x 10⁷ células) subcutáneamente en el flanco derecho de ratones sin pelo hembra de 3 a 5 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan Inc. Yokohama, Japón). Estos ratones se mantuvieron durante varias semanas para desarrollar los tumores. Los tumores establecidos se aislaron de ratones portadores de tumor y se diseccionaron en fragmentos de tejido cúbicos de 2 mm sobre un lado. Estos fragmentos se trasplantaron en serie en ratones sin pelo. Después del trasplante, estos ratones se mantuvieron hasta que el volumen del tumor promedio alcanzó 100-600 mm³.

40 Estudio de biodistribución.

- Se seleccionaron aleatoriamente ratones sin pelo portadores de tumor de cáncer de pulmón humano establecido EBC-1 y se asignaron a dos grupos. Los ratones se inyectaron intravenosamente con anticuerpos marcados con Alexa647 y marcados con ¹¹¹In (0,5 mCi/mg). Para el estudio basado en fluorescencia, la biodistribución de anticuerpos marcados con Alexa647 se evaluó con el sistema de obtención de imágenes biológicas IVIS 200 (Caliper Life Sciences, MA) 48 horas después de tratamiento. Para el estudio basado en radioisótopos, los tumores injertados se aislaron, junto con sangre, hígado, riñón, intestinos, estómago, bazo, páncreas, pulmón, corazón, músculo y huesos, respectivamente, 3, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Todos los tejidos se pesaron y se contó la radiactividad en un contador de pocillos gamma, y se determinó el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% de DI/g). En particular, el clon 6 marcado con ¹¹¹In se analizó a las 48 horas usando ratones sin pelo portadores de tumores establecidos (EBC-1, SW948, KLM-1 y H1373), respectivamente.

Radioterapia (administración única).

Se asignaron aleatoriamente ratones con xenoinjerto a tres grupos diferentes de tratamiento. Se prepararon anticuerpos

marcados con ^{90}Y (4-10 mCi/mg) como se ha descrito anteriormente. Los ratones se inyectaron intravenosamente con el clon 6 marcado con ^{90}Y o IgG1 de ratón normal marcada con ^{90}Y como control. La radiactividad de los anticuerpos inyectados se ajustó a 100 mCi por animal. Se monitorizaron el peso corporal y el volumen del tumor de los ratones tratados con xenoinjerto durante 4 semanas después de la inyección con el anticuerpo marcado con ^{90}Y . El volumen del tumor (mm^3) se calculó usando la siguiente fórmula: (el diámetro más corto) 2 x (el diámetro más largo) x 0,5.

Radioterapia (administración doble).

Se asignaron aleatoriamente ratones con xenoinjerto SW948 a cuatro grupos diferentes de tratamiento. Se conjugaron anticuerpos con p-SCN-Bn-DTPA para el radiomarcado con ^{90}Y . Se prepararon anticuerpos marcados con ^{90}Y (4-10 mCi/mg) como se ha descrito anteriormente. Los ratones se inyectaron intravenosamente con el clon 6 marcado con ^{90}Y o IgG1 normal marcada con ^{90}Y como control. La segunda inyección se realizó con el clon 6 marcado con ^{90}Y después de 14 días de la primera inyección. La radiactividad de anticuerpos inyectados se ajustó a 100 mCi por animal. Se monitorizaron el peso corporal y el volumen del tumor de los ratones tratados con xenoinjerto durante 7 semanas después de la primera inyección con el anticuerpo marcado con ^{90}Y . El volumen del tumor (mm^3) se calculó usando la siguiente fórmula: (el diámetro más corto) 2 x (el diámetro más largo) x 0,5.

Tinción con HE.

Se incorporaron tumores aislados con el compuesto Lab-Tek OCT (Sakura Finetek USA, CA) sobre hielo seco para preparar sección de tejido congelada. Las secciones congeladas se lavaron con agua destilada para eliminar el compuesto OCT, y se trataron dos veces con xileno durante 5 min. Para lavar el exceso de xileno y rehidratar, las secciones se aclararon con 100 %, 90 %, 80 %, 70 % y 50 % de etanol durante 10 s, respectivamente. Las secciones de portaobjetos se sumergieron en hematoxilina de Mayer (Muto Pure Chemicals, Japón) durante 5 min, y se lavó el exceso de hematoxilina con agua corriente. A continuación, se realizó la deshidratación usando 50 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % de etanol después del tratamiento con 1 % de eosina Y (Muto Pure Chemicals, Japón). Finalmente, las secciones se trataron tres veces con xileno durante 5 min, se envolvieron en serie por Malinol (DAIDO SANGYO, Japón).

Secuencia de aminoácidos.

Se extrajeron ARN totales del clon nº 6 de hibridoma usando el kit RNeasy Mini (QIAGEN). Se sintetizó ADNc a partir del ARN total usando transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen). Las secuencias de regiones variables de anticuerpos monoclonales se amplificaron usando ADN polimerasa NovaTaq (Novagen) y el conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen). La secuencia de regiones variables de anticuerpos monoclonales se amplificaron usando el cebador de 5'; MulgV_H5'-B; 5'- **GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCTT-3'** (SEQ ID NO: 4) para la cadena pesada, y Mulg kappa V_L5'-G; 5'- **ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT-3'** (SEQ ID NO: 5), 5' -**ACTAGTCGACATGGATTTCARGTGCAGATTWTCAGCTT-3'** (SEQ ID NO: 6), 5' -**ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTCTCGG-3'** (SEQ ID NO: 7) y 5' -**ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG-3'** (SEQ ID NO: 8) para la cadena ligera del clon nº 6 y el cebador de 3'; MulgGV_H3'-2; 5'- **CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG-3'** (SEQ ID NO: 9) para la cadena pesada y Mulg kappa V_L3'-1; 5'- **CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'** (SEQ ID NO: 10) para la cadena ligera. Los productos de PCR se clonaron en pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Se secuenciaron las regiones de inserto y se determinó la secuencia de la región variable (excepto por la secuencia señal) del clon nº 6.

Se usan los siguientes símbolos para los diferentes nucleótidos en las secuencias de cebadores; B como C, G o T, D como A, G o T, H como A, C o T, I como inosina, K como G o T, M como A o C, R como A o G, S como C o G, V como A, C o G, W como A o T e Y como C o T.

Anticuerpo quimérico de ratón/humano

Se preparó el anticuerpo quimérico de ratón/ser humano quim nº 6 basado en el clon nº 6 del anticuerpo monoclonal de ratón usando el sistema de expresión GS Gene (Lonza, Suiza). Se amplificaron tanto la cadena pesada como la cadena ligera por reacción en cadena de la polimerasa por extensión por solapamiento. La región variable de la cadena pesada se amplificó por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 23 y 24. La región constante de IgG1 humana se amplificó por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 27 y 28. Estos dos productos de PCR contuvieron secuencia común en el extremo para la extensión por solapamiento. Entonces, se amplificó el gen de cadena pesada con estos dos productos de PCR por extensión por solapamiento usando los cebadores de SEQ ID NO: 31 y 28. De la misma manera, la región variable de la cadena ligera se amplificó por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 25 y 26. La región constante de kappa humana se amplificó por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 29 y 30. El gen de la cadena ligera se amplificó con estos dos productos de PCR que contienen secuencia común en el extremo por PCR por extensión por solapamiento usando cebadores de SEQ ID NO: 32 y 30. Los genes correspondientes a cada una de las regiones variables de la cadena ligera y cadena pesada se amplificaron con la región constante de kappa humana (SEQ ID NO: 19

que codifica SEQ ID NO: 21) e IgG1 humana (SEQ ID NO: 20 que codifica SEQ ID NO: 22), respectivamente, por PCR y se clonaron en un vector de expresión de anticuerpo pEE12.4 y pEE6.4, respectivamente, usando la enzima de restricción HindIII y EcoRI. Estos dos vectores de gen individual (SGV) se digirieron con la enzima de restricción NotI y PvuI. El ADN de SGV de la cadena pesada digerido contiene la unidad de transcripción hCMV-promotor MIE-cadena pesada-SV40 y el ADN de SGV de la cadena ligera digerido contiene la unidad de transcripción de GS y el casete de expresión de hCMV-promotor MIE-cadena ligera. Ambos fragmentos purificados se ligaron para construir el vector de expresión de gen doble. Se transformaron células de *E. coli* con el vector y a continuación se preparó el vector. El vector que expresa tanto la cadena H con las cadenas L se transfirió en células 293T. El medio se intercambió con medio sin suero (DMEM; GIBCO, 11965-092), y el anticuerpo quimérico contenido en el sobrenadante de cultivo se purificó mediante columna de proteína A.

[Tabla 1]

Conjunto de cebadores para la preparación de quim nº 6

SEC ID Nº	cebador	secuencia
23	HindIIICDH3#6VH-f	AAGCTTGCCGCCACCATGAAATGGAGCTGGGTATTTC
24	CDH3#6VHCH-r	CCCTTGGTGGAGGCTGCAGAGACAGTGACC
25	HindIIICDH3#6VL-f	AAGCTTGCCGCCACCATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGC
26	CDH3#6VLkappa-r	CGTTTTAATTCCAGCTTGGTGCCTCCACC
27	CDH3#6VHCH-f	CTCTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
28	EcoRIIgG1-r	TTATTAGAATTCCTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC
29	CDH3#6VLkappa-f	ACCAAGCTGGAATTAACCGTACTGTTGC
30	EcoRIKappa-r	TTATTAGAATTCCTATCAACATTCACCACGATTAAAA GATTAGTAACAGG
31	HindIIIB7.3CDH3#6H-f	CACGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTG TTCTGTTCTTTCTGTCCGTGACCACAGCGTGCATTCTCAGGTCCA ACTGCAGCAGCCTGGG
32	HindIIIB7.3CDH3#6L-f	ACGAAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGG TGCTGGGACTGTGTGCTGTGTGGCTGACAGACGCCCG CTGTCAAATTGTTCTACCCAGTCTC

Resultados.

Primero, para evaluar la especificidad de anticuerpos anti-CDH3, se determinó la expresión de CDH3 en varias líneas celulares. El antígeno CDH3 estaba presente sobre la superficie de H358 y KLM-1, pero no sobre MIAPaCa-2 (Figura 1). Los anticuerpos, que mostraron reactividad satisfactoria con H358 y KLM-1 pero no con MIAPaCa-2, se cribaron usando citómetro de flujo. Como se muestra en la Figura 1, todos los anticuerpos anti-CDH3 cribados reconocieron correcta y específicamente proteína CDH3 nativa.

Segundo, se comprobó la biodistribución de anticuerpos anti-CDH3 usando modelos de xenoinjerto. Los anticuerpos nº 4 y nº 6 marcados con Alexa647 se acumularon en tumores a nivel muy alto en comparación con otros clones y anticuerpo de control (Figura 2A). Se seleccionó el nº 6 para radioterapia con ⁹⁰Y debido a que el nº 6 marcado con ¹¹¹In mostró eliminación de la sangre más rápida y alta elección de tumores como diana sin acumulación inesperada en órganos normales en comparación con los otros (Figura 2B-F). La captación pico del clon 6 en el tumor fue 32,0 +/- 3,5 % de DI/g (EBC-1), 21,4 +/- 2,3 % de DI/g (SW948), 24,2 +/- 1,2 % de DI/g (KLM-1), 23,8 +/- 3,1 % de DI/g (H1373), respectivamente, 48 h después de la inyección (Figura 3A-D). De la misma forma, la captación pico del anticuerpo

químico del clon 6 llamado quim nº 6 en el tumor fue 38,0 +/- 3,2 % de DI/g (H1373) 48 h después de la inyección (Figura 3E). A diferencia, la captación de IgG de control nunca superó el 10 % de DI/g en cada ratón (Figura 3A-E). Esta captación específica de tumor del clon 6 y quim nº 6 aumentó en función del tiempo (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 3A-E, tejidos normales mostraron niveles de captación bastante bajos, de acuerdo con el perfil de expresión exclusivo de CDH3. Como se muestra en el estudio de biodistribución, la captación del clon 6 se observó de manera específica de tumor presentador de CDH3. Por tanto, el anticuerpo tiene una propiedad ideal para desarrollarse como una medicina de anticuerpo marcado con radioisótopo.

Tercero, se realizó radioterapia con el clon 6 y quim nº 6 marcados con ^{90}Y usando ratones con xenoinjerto. Todos los tumores disminuyeron espectacularmente la tasa de crecimiento por radiación de itrio-90 conjugado con el clon 6 (Figura 4A, 5A, 6, 7) y quim nº 6 (Figura 8). Por otra parte, el anticuerpo de control marcado con ^{90}Y no mostró efecto sobre el crecimiento tumoral (Figura 4A, 5A, 6, 7, 8). Por tanto, este efecto terapéutico pareció depender de la reacción de antígeno-anticuerpo. El tratamiento para tumores EBC-1 (cáncer de pulmón) mostró enfermedad estable durante un mes por solo inyección individual (Figura 4A). Se aislaron los tumores y se realizó tinción con HE después de la radioterapia. Como se muestra en la Figura 4B, el número de células tumorales disminuyó espectacularmente y se observó fibrosis marcada por el tratamiento con el clon 6 marcado con ^{90}Y . Es notable que no se observó fibrosis en tumores tratados con IgG de control marcada con ^{90}Y (Figura 4B). Asimismo, los tumores SW948 (cáncer de colon) mostraron respuesta parcial por el tratamiento (Figura 5). Los tumores trasplantados casi desaparecieron en cada ratón después de 21 días de la inyección del clon 6 marcado con ^{90}Y (Figura 5B). Mientras tanto, los tumores KLM-1 (cáncer pancreático) mostraron enfermedad estable o estado de enfermedad ligeramente progresiva por el tratamiento (Figura 6). Pero el tratamiento con el clon 6 marcado con ^{90}Y fue eficaz en comparación con el de anticuerpo no marcado. La administración doble del clon 6 marcado con ^{90}Y fue más eficaz que la administración individual en cada ratón (Figura 7). Además, quim nº 6 marcado con ^{90}Y de manera que el clon 6 del anticuerpo químico muestra alta eficacia en comparación con los controles (Figura 8). CHX y SCN en la Figura 8 representan conectores descritos en Materiales y procedimientos.

Tomados conjuntamente, el clon 6 y quim nº 6 del anticuerpo anti-CDH3 y conjugados con itrio-90 ejercieron efectos terapéuticos sorprendentes contra estos tumores. Por tanto, CDH3 es una diana terapéutica atractiva para estos tumores y el anticuerpo anti-CDH3 es un candidato a fármaco terapéutico útil para este tipo de tratamiento.

Finalmente, se determinaron la secuencia de aminoácidos de regiones variables de la cadena H y regiones variables de la cadena L de Ig de ratón del siguiente modo:

Clon nº 6, región variable de la cadena H (excepto por la secuencia señal):

**QVQLQQPGAELVKPGTSLKLSCKSSGYTFTSYWIHWVKQRPGHGLEWIGEI
DPSDNYTYYNQNFKGKATLTIDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVFYCARSGYGNL
FVYWGQGTLVTVSA (SEC ID N°: 11);**

y

Clon nº 6, región variable de la cadena L (excepto por la secuencia señal):

**QIVLTQS-
PAIMSSSPGEKVTMCSATSSVTYMYWYQQKPGSSPKPWIFRTSNLASGVPTR
FSGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYYCQHYHIYPRTFGGGTKL (SEC ID N°:
12).**

Las secuencias de la CDR (región determinante de la complementariedad) de los anticuerpos se determinaron por la definición de Kabat del siguiente modo:

Clon nº 6, **SYWIH** (SEQ ID NO: 13) como CDR1 de VH, **EIDPSDNYTYYNQNFKG** (SEQ ID NO: 14) como CDR2 de VH y **SGYGNLFVY** (SEQ ID NO: 15) como CDR3 de VH, **SATSSVTYMY** (SEQ ID NO: 16) como CDR1 de VL, **RTSNLAS** (SEQ ID NO: 17) como CDR2 de VL y **QHYHIYPRT** (SEQ ID NO: 18) como CDR3 de VL.

Aplicabilidad industrial

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que un cáncer que expresa CDH3 puede tratarse con anticuerpo anti-CDH3 marcado con radioisótopo *in vivo*. El CDH3 se identificó como un gen fuertemente expresado en cánceres pancreáticos, de pulmón, colon, próstata, mama, gástricos o de hígado. Así, el tratamiento de un cáncer, por ejemplo, cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado se lleva a cabo convenientemente usando anticuerpos anti-CDH3 marcados con etiqueta de radioisótopo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTERAPY SCIENCE, INC.

THE UNIVERSITY OF TOKYO

NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY

5 <120> ANTICUERPOS ANTI-CDH3 MARCADOS CON ETIQUETA DE RADIOISÓTOPO Y USOS DE LOS MISMOS

<130> ONC-A0809P

10 <150> US 61/076.982

<151> 30-06-2008

<160> 32

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 4276

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

tgcggttttaa aaattgtctt tatttacatt ttacagaaag ttgagaaagt gttatttata	60
tggtggggtag gggtgctgga gattatgaga ctaataacaa ccctcttagc tcgcaccctt	120
tggcaccact acagcttcca aactctggga ctttctcgac tagcttccct ttgttttagct	180
gtgaaatgga agaagcggtc cgggtgtggc ggctcatgcc tgtaacctga gcactctggg	240
aggcggagga tcgcttgagt ccagaagtc aagaccagct tgggcaacat agggtgaccc	300
tccaccctcc ccccgcccca ccacatcgct acaaaaaatt tttaaaaatt agccgggtgt	360
ggtggcgcaa gcctgtagtc tcagcgggag ctgagggagg agaatcgctt cagcccgga	420
ggtcgaggct gtagtgagcc gagatcgccg tactgcactc ctgggcgaca gagcgagacc	480
ctgtctccaa aaaaaaaaaa aaaagaaaaa agaggaagtt gtatccaatt cagaaacgcg	540
gtccttcggg acctgctagt ttatatcccc ggaggatcct ccccgcgggg ctggcacggg	600
aggcggagaa agaggcttgg gcggccccgc tgtagccgcg tgtgggagga cgcacgggcc	660
tgcttcaaag ctttgggata acagcgctc cgggggataa tgaatgcgga gcctccgttt	720
tcagtcgact tcagatgtgt ctccactttt ttccgctgta gccgcaaggc aaggaaacat	780
ttctcttccc gtactgagga ggctgaggag tgcactgggt gttcttttct cctctaacc	840
agaactgcga gacagaggct gagtccctgt aaagaacagc tccagaaaag ccaggagagc	900
gcaggagggc atccgggagg ccaggagggg ttcgctgggg cctcaaccgc acccacatcg	960
gtcccacctg cgagggggcg ggacctcgtg gcgctggacc aatcagcacc cacctgcgct	1020
cacctggcct cctcccgtg gctcccgggg gctgcggtgc tcaaaggggc aagagctgag	1080
cggaaacacc gcccgccgtc gcggcagctg cttcaccctt ctctctgcag ccattggggct	1140
ccctcgtgga cctctcgcgt ctctctcctt tctccaggtt tgctggctgc agtgcgcggc	1200

ctccgagccg tgcggggcgg tcttcagggg ggctgaagtg accttgaggg cgggaggcgc	1260
ggagcaggag cccggccagg cgctggggaa agtattcatg ggctgccctg ggcaagagcc	1320
agctctgttt agcactgata atgatgactt cactgtgcgg aatggcgaga cagtccagga	1380
aagaaggtca ctgaaggaaa ggaatccatt gaagatcttc ccatccaaac gtatcttacg	1440
aagacacaag agagattggg tgggtgctcc aatatctgtc cctgaaaatg gcaagggtcc	1500
cttccccag agactgaatc agctcaagtc taataaagat agagacacca agattttcta	1560
cagcatcacg gggccggggg cagacagccc ccctgagggt gtcttcgctg tagagaagga	1620
gacaggctgg ttgttggtga ataagccact ggaccgggag gagattgcca agtatgagct	1680
ctttggccac gctgtgtcag agaatggtgc ctcaagtggg gaccccatga acatctccat	1740
catcgtgacc gaccagaatg accacaagcc caagtttacc caggacacct tccgagggag	1800
tgtcttagag ggagtcctac caggtaactt tgtgatgcag gtgacagcca cggatgagga	1860
tgatgccatc tacacctaca atggggtggg tgcttactcc atccatagcc aagaacaaa	1920
ggaccacac gacctcatgt tcaccattca ccggagcaca ggcaccatca gcgtcatctc	1980
cagtggcctg gaccgggaaa aagtccttga gtacacactg accatccagg ccacagacat	2040
ggatggggac ggctccacca ccacggcagt ggcagtagtg gagatccttg atgccaatga	2100
caatgctccc atgtttgacc ccagaagta cgaggcccat gtgcctgaga atgcagtggg	2160
ccatgagggtg cagaggctga cggtaactga tctggacgcc cccaactcac cagcgtggcg	2220
tgccacctac ctatcatgg gcggtgacga cggggaccat ttaccatca ccacccaccc	2280
tgagagcaac cagggcaccc tgacaaccag gaagggtttg gattttgagg caaaaacca	2340
gcacaccctg tacgttgaag tgaccaacga ggcccccttt gtgctgaagc tcccaacctc	2400
cacagccacc atagtgggtc acgtggagga tgtgaatgag gcacctgtgt ttgtcccacc	2460
ctccaaagtc gttgagggtc aggagggcat ccccaactgg gagcctgtgt gtgtctacac	2520
tgcagaagac cctgacaagg agaataaaaa gatcagctac cgcacctga gagaccacg	2580
agggtggcta gccatggacc cagacagtgg gcaggtcaca gctgtgggca ccctcgaccg	2640
tgaggatgag cagtttgtga ggaacaacat ctatgaagtc atggtcttgg ccatggacaa	2700
tggaagccct cccaccactg gcacgggaac ccttctgcta aactgattg atgtcaatga	2760
ccatggccca gtccctgagc ccgctcagat caccatctgc aaccaaagcc ctgtgcgcca	2820
ggtgctgaac atcacggaca aggacctgtc tccccacacc tcccccttcc agggccagct	2880
cacagatgac tcagacatct actggacggc agaggccaac gaggaagggt acacagtggg	2940
cttgtccctg aagaagttcc tgaagcagga tacatatgac gtgcacctt ctctgtctga	3000
ccatggcaac aaagagcagc tgacggtgat cagggccact gtgtgcgact gccatggcca	3060

tgtcgaaacc tgccctggac cctggaaggg aggtttcatc ctccctgtgc tgggggctgt 3120
 cctggctctg ctgttcctcc tgcctggtgct gcttttgttg gtgagaaaga agcgaagat 3180
 caaggagccc ctctactcc cagaagatga caccctgac aacgtcttct actatggcga 3240
 agaggggggt ggcgaagagg accaggacta tgacatcacc cagctccacc gaggtctgga 3300
 ggccaggccg gaggtggttc tccgcaatga cgtggcacca accatcatcc cgacacccat 3360
 gtaccgtcct cggccagcca acccagatga aatcggcaac tttataattg agaacctgaa 3420
 ggcggctaac acagacccca cagccccgcc ctacgacacc ctcttggtgt tcgactatga 3480
 gggcagcggc tccgacgccg cgtccctgag ctccctcacc tcctccgcct ccgaccaaga 3540
 ccaagattac gattatctga acgagtggg cagccgcttc aagaagctgg cagacatgta 3600
 cgggtggcggg gaggacgact agggggcctg cctgcagggc tggggaccaa acgtcaggcc 3660
 acagagcatc tccaaggggt ctcatgtccc ccttcagctg aggacttcgg agcttgtcag 3720
 gaagtggccg tagcaacttg gcggagacag gctatgagtc tgacgttaga gtggtggctt 3780
 ccttagcctt tcaggatgga ggaatgtggg cagtttgact tcagcactga aaacctctcc 3840
 acctgggcca gggttgcctc agaggccaag tttccagaag cctcttacct gccgtaaaat 3900
 gctcaaccct gtgtcctggg cctgggcctg ctgtgactga cctacagtgg actttctctc 3960
 tggaatggaa ccttcttagg cctcctggtg caacttaatt ttttttttta atgctatctt 4020
 caaaacgtta gagaaagttc ttcaaaagtg cagccagag ctgctgggcc cactggccgt 4080
 cctgcatttc tggtttccag accccaatgc ctccattcg gatggatctc tgcgttttta 4140
 tactgagtgt gcctaggttg ccccttattt tttattttcc ctggtgcgtt gctatagatg 4200
 aagggtgagg acaatcgtgt atatgtacta gaactttttt attaaagaaa cttttccag 4260
 aggtgcctgg ggagtg 4276

<210> 2

<211> 829

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val
 1 5 10 15
 Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly
 35 40 45
 Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala

10

ES 2 534 437 T3

50										55										60									
Leu	Phe	Ser	Thr	Asp	Asn	Asp	Asp	Phe	Thr	Val	Arg	Asn	Gly	Glu	Thr														
65					70					75					80														
Val	Gln	Glu	Arg	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Arg	Asn	Pro	Leu	Lys	Ile	Phe														
				85					90					95															
Pro	Ser	Lys	Arg	Ile	Leu	Arg	Arg	His	Lys	Arg	Asp	Trp	Val	Val	Ala														
			100					105					110																
Pro	Ile	Ser	Val	Pro	Glu	Asn	Gly	Lys	Gly	Pro	Phe	Pro	Gln	Arg	Leu														
		115					120					125																	
Asn	Gln	Leu	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Arg	Asp	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Ser														
	130					135					140																		
Ile	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Val	Phe	Ala	Val														
145					150					155					160														
Glu	Lys	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Asn	Lys	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu														
				165					170					175															
Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Glu	Leu	Phe	Gly	His	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gly														
		180						185					190																
Ala	Ser	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Asn	Ile	Ser	Ile	Ile	Val	Thr	Asp	Gln														
		195					200					205																	
Asn	Asp	His	Lys	Pro	Lys	Phe	Thr	Gln	Asp	Thr	Phe	Arg	Gly	Ser	Val														
	210					215					220																		
Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Gln	Val	Thr	Ala	Thr														
225					230					235					240														
Asp	Glu	Asp	Asp	Ala	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Tyr	Ser														
				245					250					255															
Ile	His	Ser	Gln	Glu	Pro	Lys	Asp	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile														
			260					265					270																
His	Arg	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg														
		275					280					285																	
Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp														
	290					295					300																		

Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp
305 310 315 320

Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His
325 330 335

Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr
340 345 350

Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile
355 360 365

Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu
370 375 380

Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala
385 390 395 400

Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe
405 410 415

Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu
420 425 430

Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu
435 440 445

Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala
450 455 460

Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg
465 470 475 480

Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr
485 490 495

Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn
500 505 510

Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr
515 520 525

Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His
530 535 540

Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro
545 550 555 560

Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr
565 570 575

Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr
580 585 590

Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys
595 600 605

Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His
610 615 620

Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys
625 630 635 640

His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile
645 650 655

Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Leu Val
660 665 670

Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu
675 680 685

Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu
690 695 700

Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg
705 710 715 720

Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro
725 730 735

Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp
740 745 750

Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp
755 760 765

Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly
770 775 780

Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser
785 790 795 800

Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe
805 810 815

Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp
820 825

<210> 3

5

<211> 654

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> antígeno para el anticuerpo

5

<400> 3

```

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

Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg
 20           25           30

Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly
 35           40           45

Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala
 50           55           60

Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr
 65           70           75           80

Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe
 85           90           95

Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val Val Ala
 100          105          110

Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu
 115          120          125

Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser
 130          135          140

Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val
 145          150          155          160

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

Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly
 180          185          190

```

Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln
195 200 205

Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val
210 215 220

Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr
225 230 235 240

Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser
245 250 255

Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile
260 265 270

His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg
275 280 285

Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp
290 295 300

Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp
305 310 315 320

Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His
325 330 335

Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr
340 345 350

Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile
355 360 365

Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu
370 375 380

Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala
385 390 395 400

Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe
405 410 415

Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu
420 425 430

Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu
435 440 445

Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala
450 455 460

Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg
465 470 475 480

Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr
485 490 495

Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn
500 505 510

Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr
515 520 525

Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His
530 535 540

Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro
545 550 555 560

Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr
565 570 575

Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr
580 585 590

Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys
595 600 605

Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His
610 615 620

Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys
625 630 635 640

His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly
645 650

<210> 4

<211> 34

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VH5'

10

<400> 4

	gggaattcat graatgsasc tgggtywtgc tctt	34
	<210> 5	
	<211> 39	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador VL5'-1	
10	<400> 5	
	actagtcgac atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct	39
	<210> 6	
	<211> 39	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador VL5'-2	
20	<400> 6	
	actagtcgac atggatttgc argtgcagat twtcagctt	39
	<210> 7	
25	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> cebador VL5'-3	
	<400> 7	
	actagtcgac atggtyctya tvtccttgct gttctgg	37

	<210> 8	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5		
	<220>	
	<223> cebador VL5'-4	
	<400> 8	
10	actagtcgac atggyctya tvttctctgct gctatgg	37
	<210> 9	
	<211> 35	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador VH3'	
20	<400> 9	
	cccaagcttc cagggrccar kggataraci grtgg	35
	<210> 10	
	<211> 30	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador VL3'	
30	<400> 10	
	cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga	30
	<210> 11	

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> región variable de la cadena H

<400> 11

```

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

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

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

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Asn Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Asn Phe
50          55          60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Leu Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ala
          115

```

10

<210> 12

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> región variable de la cadena L

<400> 12

20

ES 2 534 437 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Thr Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ile Tyr Pro Arg Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100

<210> 13

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de VH

10

<400> 13

Ser Tyr Trp Ile His
 1 5

15 <210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> CDR2 de VH

<400> 14

ES 2 534 437 T3

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Asn Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de VH

10

<400> 15

Ser Gly Tyr Gly Asn Leu Phe Val Tyr
1 5

15 <210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> CDR1 de VL

<400> 16

Ser Ala Thr Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr
1 5 10

25

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de VL

<400> 17

5 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de VL

15 <400> 18

Gln His Tyr His Ile Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 19

20 <211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

25

gaattaaaac gtactgttgc tgctccttct gtttttattt ttcctccttc tgatgaacaa	60
ttaaaatctg gtactgcttc tggtgtttgt ttattaaata atttttatcc tcgtgaagct	120
aaagttcaat ggaaagttga taatgcttta caatctggta attctcaaga atctgttact	180
gaacaagatt ctaaagattc tacttattct ttatcttcta ctttaacttt atctaaagct	240
gattatgaaa aacataaagt ttatgcttgt gaagttactc atcaagggtt atcttctcct	300
gttactaaat cttttaatcg tggatgaatgt	330

<210> 20

30 <211> 990

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

5

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg    120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc    300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cactgaact cctgggggga    360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg    480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac    540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactgggt gaatggcaag    600
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccacgagaa aacctctctc    660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgcccccatc ccgggatgag    720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc    780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg    840
ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg    900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg    960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa

```

<210> 21

<211> 110

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1           5           10           15

```

15

```

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

```

ES 2 534 437 T3

[illegible]

<210> 22
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	1
1				5					10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35					40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50					55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70					75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90					95		
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	

ES 2 534 437 T3

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

<210> 23

<211> 39

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> HindIIICDH3#6VH-f

10

<400> 23

aagcttgccg ccaccatgaa atggagctgg gttattctc

39

	<210> 24	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CDH3#6VHCH-r	
10	<400> 24	
	cccttggtgg aggctgcaga gacagtgacc	30
	<210> 25	
	<211> 42	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> HindIIICDH3#6VL-f	
20	<400> 25	
	aagcttgccg ccaccatgga ttacaggtg cagattatca gc	42
	<210> 26	
25	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> CDH3#6VLkappa-r	
	<400> 26	
	cgttttaatt ccagcttggg gcctccacc	29

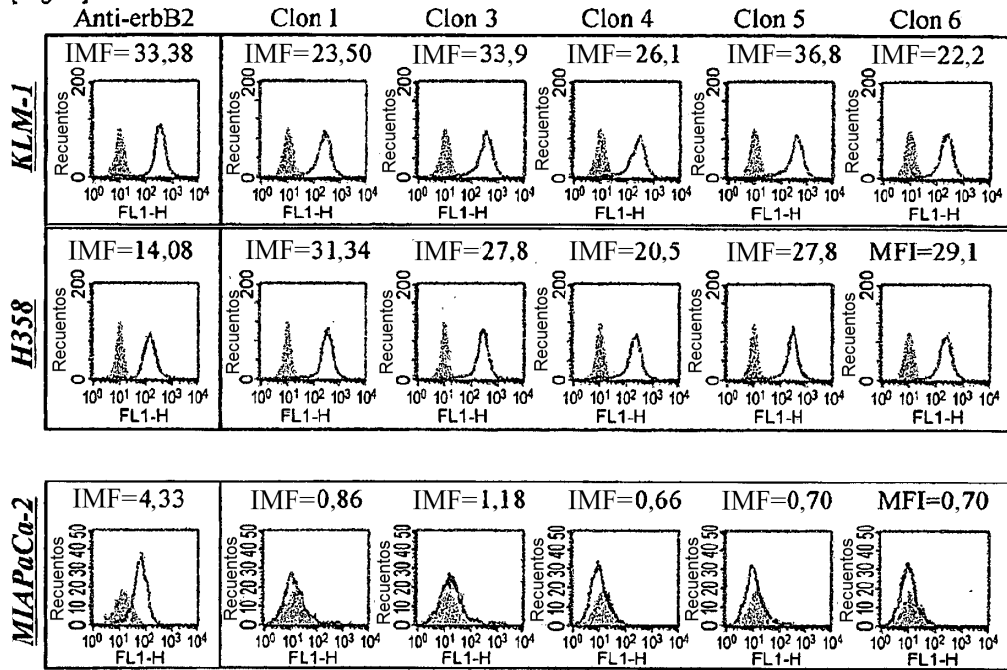
	<210> 27	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5		
	<220>	
	<223> CDH3#6VHCH-f	
	<400> 27	
10	ctctgcagcc tccaccaagg gcccatcgg	29
	<210> 28	
	<211> 41	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> EcoRIIlgG1-r	
20	<400> 28	
	ttattagaat tcctatcatt taccgggaga caggagagg c	41
	<210> 29	
	<211> 29	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> CDH3#6VLkappa-f	
30		
	<400> 29	
	accaagctgg aattaaaacg tactgttgc	29
	<210> 30	
35	<211> 51	

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> EcoRIKappa-r
 5
 <400> 30
ttattagaat tcctatcaac attcaccacg attaaaagat ttagtaacag g 51
 <210> 31
 10 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> HindIIIB72.3CDH3#6H-f
 <400> 31
cacgaagctt gccgccacca tggaatggag ctgggtgttc ctgttctttc tgtccgtgac 60
cacaggcgtg cattctcagg tccaactgca gcagcctggg 100
 20
 <210> 32
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> HindIIIB72.3CDH3#6L-f
 <400> 32
 30
acgaagcttg ccgccaccat gtctgtgcct acccaggtgc tgggactgct gctgctgtgg 60
ctgacagacg cccgctgtca aattgttctc acccagtctc 100

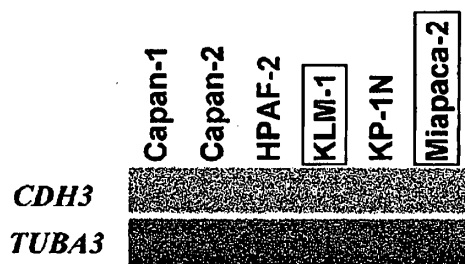
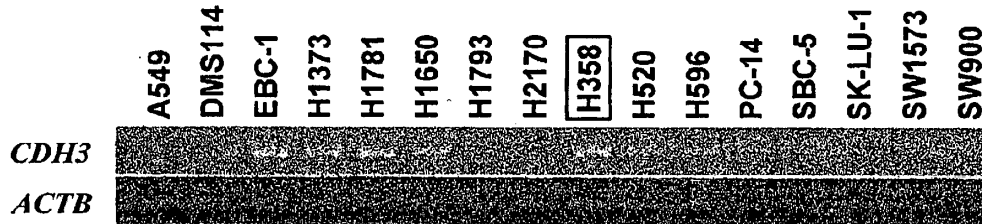
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo, que reconoce específicamente un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es
 - (i) un anticuerpo que comprende regiones variables definidas por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12, o un fragmento de unión del anticuerpo, en el que dicho fragmento de unión comprende regiones variables definidas por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12; o
 - (ii) un anticuerpo definido por CDR de VH que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 14 y 15 y CDR de VL que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17 y 18, o un fragmento de unión del anticuerpo, en el que dicho fragmento de unión comprende CDR de VH que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 14 y 15 y CDR de VL que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17 y 18.
2. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo y anticuerpo monocatenario.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 y/o una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo quimérico comprende una región variable (V) de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo quimérico comprende una región variable (V) de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo quimérico comprende una región variable (V) de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 y una región variable (V) de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
7. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo humanizado comprende además una región FR (región estructural) de anticuerpo humano y/o una región C de anticuerpo humano.
9. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que está conjugado con un citotóxico, un agente terapéutico, una etiqueta de radioisótopo o una etiqueta fluorescente.
10. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 9, en el que la etiqueta de radioisótopo está seleccionada de ^{90}Y e ^{111}In .
11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que está asociada a CDH3.
12. Uso del anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad que está asociada a CDH3.
13. Un procedimiento para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3 o de una predisposición a desarrollar la enfermedad en un sujeto, que comprende
 - (a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10;
 - (b) detectar la proteína CDH3 en la muestra o espécimen; y
 - (c) juzgar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar la enfermedad basándose en la abundancia relativa de la proteína CDH3 en comparación con un control.
14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Un kit para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada a CDH3, que comprende el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

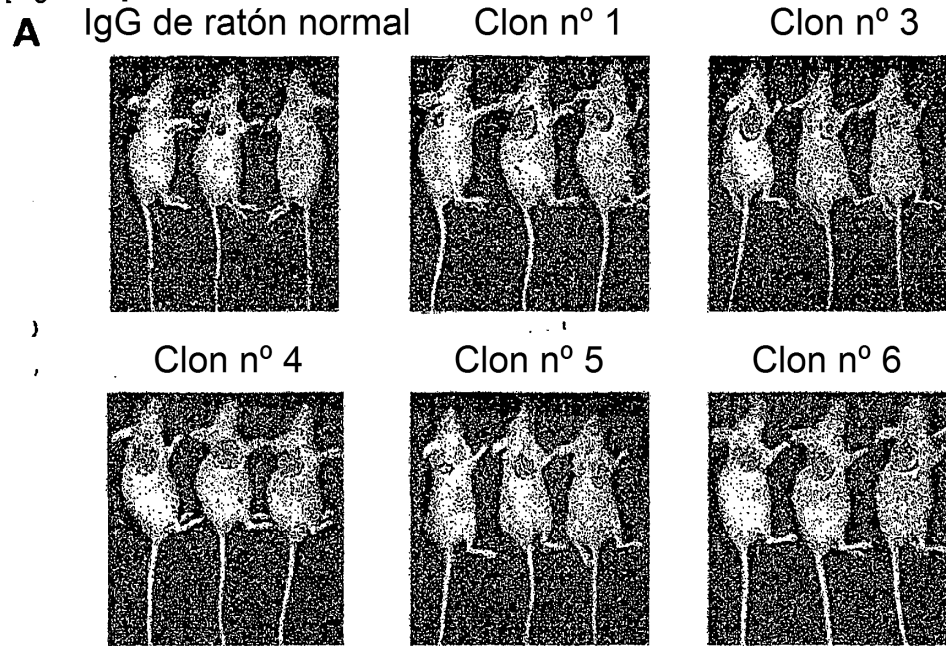
[Fig. 1]



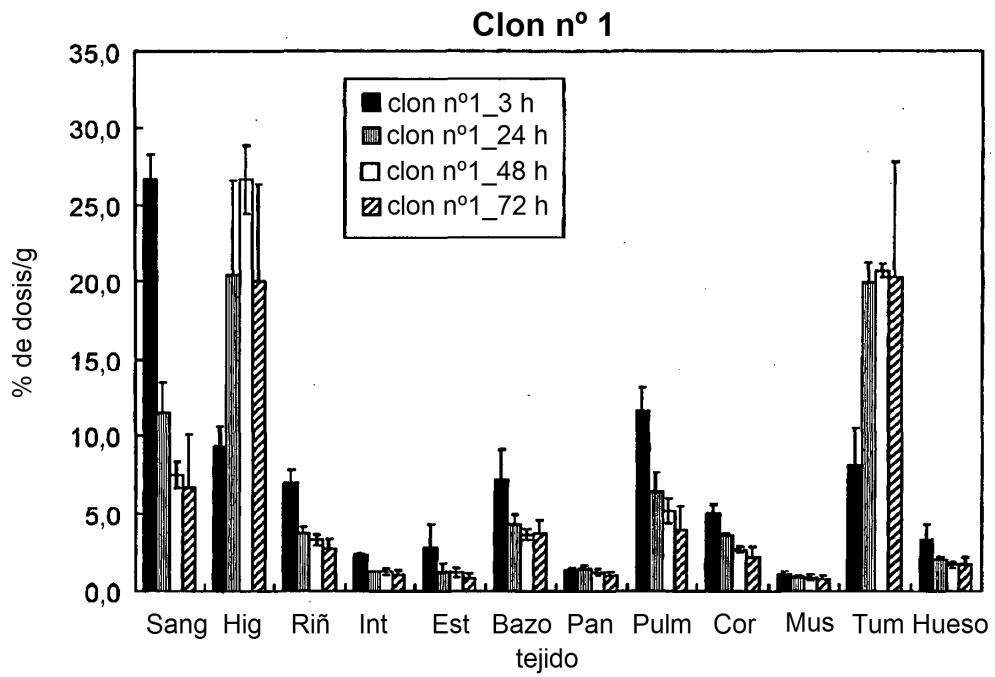
IMF: Intensidad media de fluorescencia



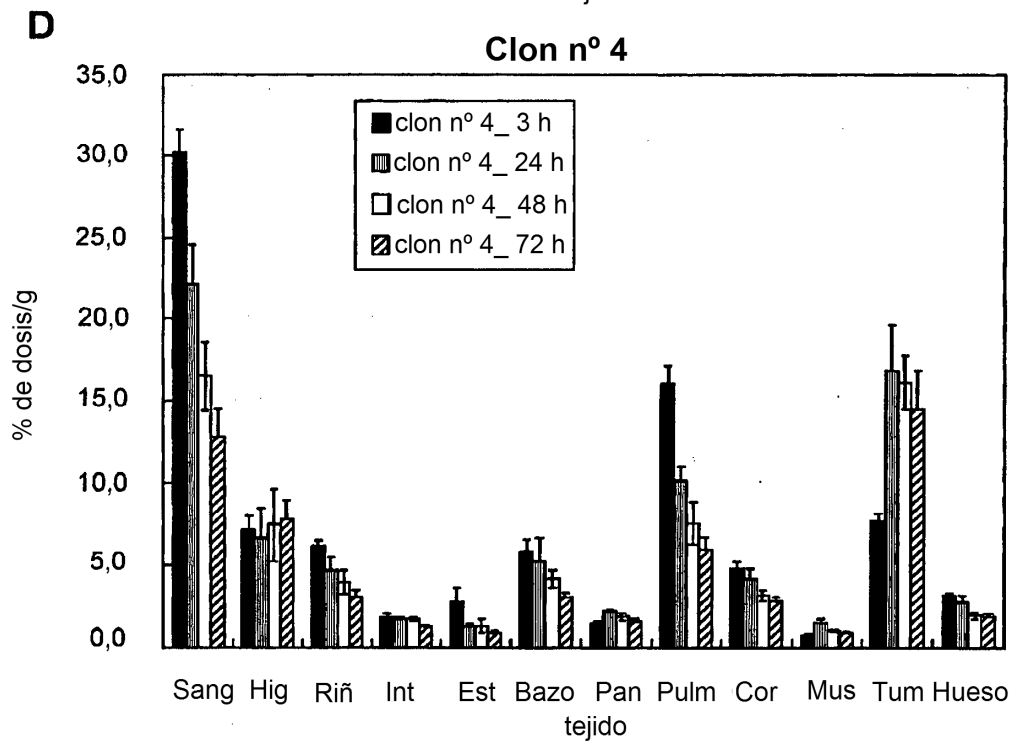
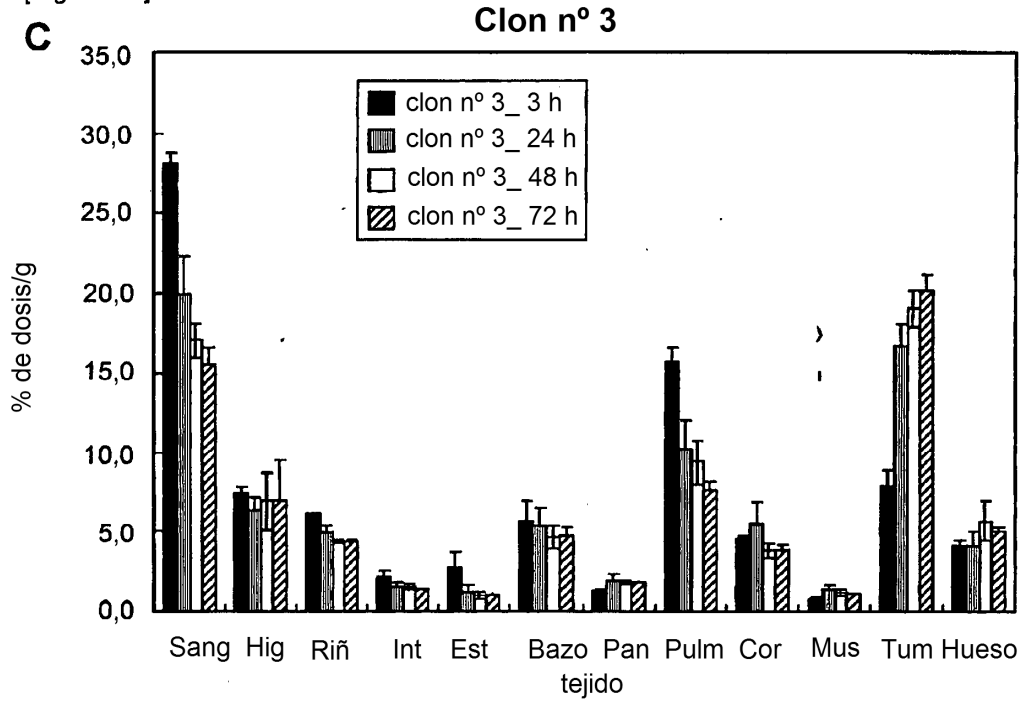
[Fig. 2A-B]



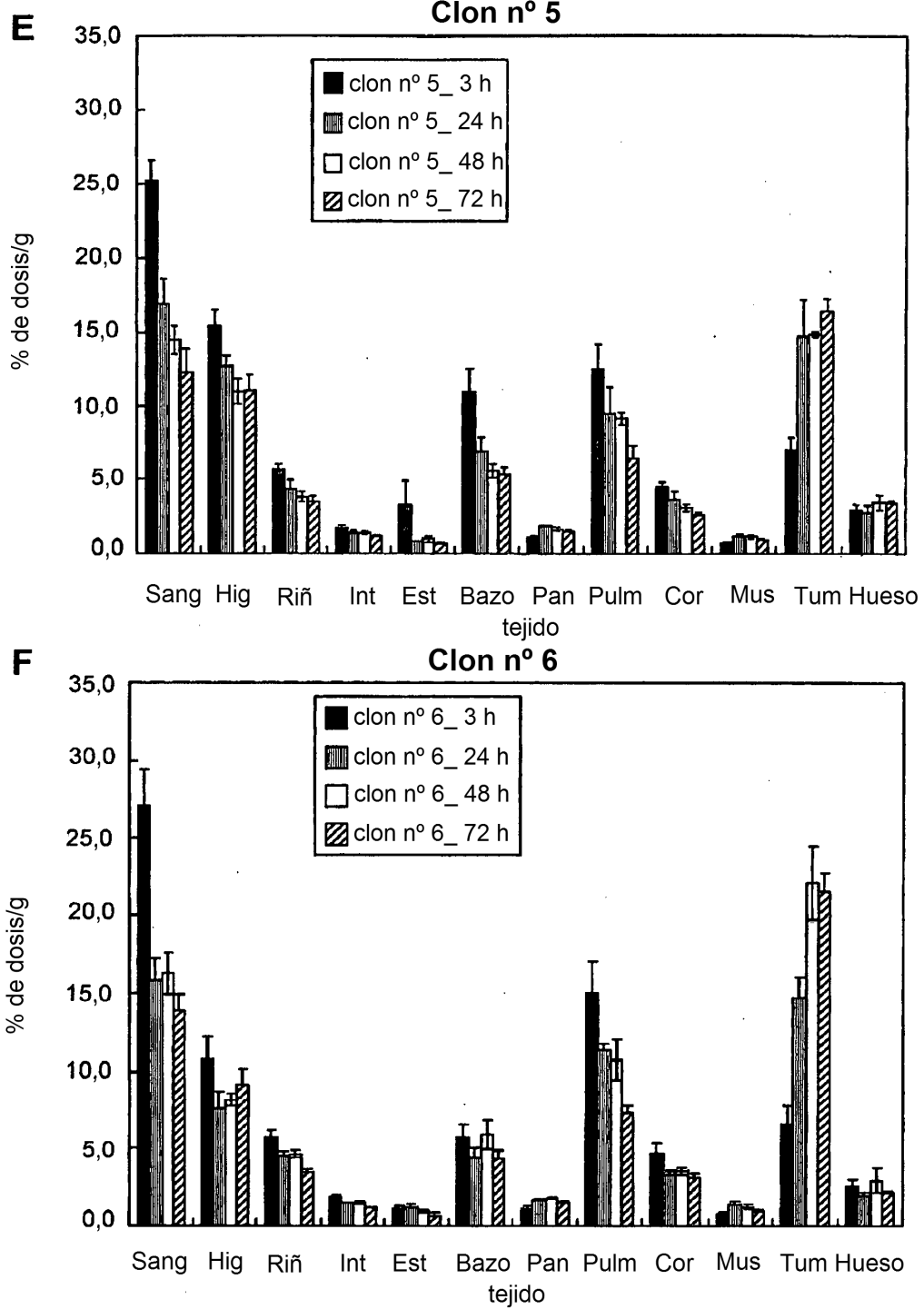
B



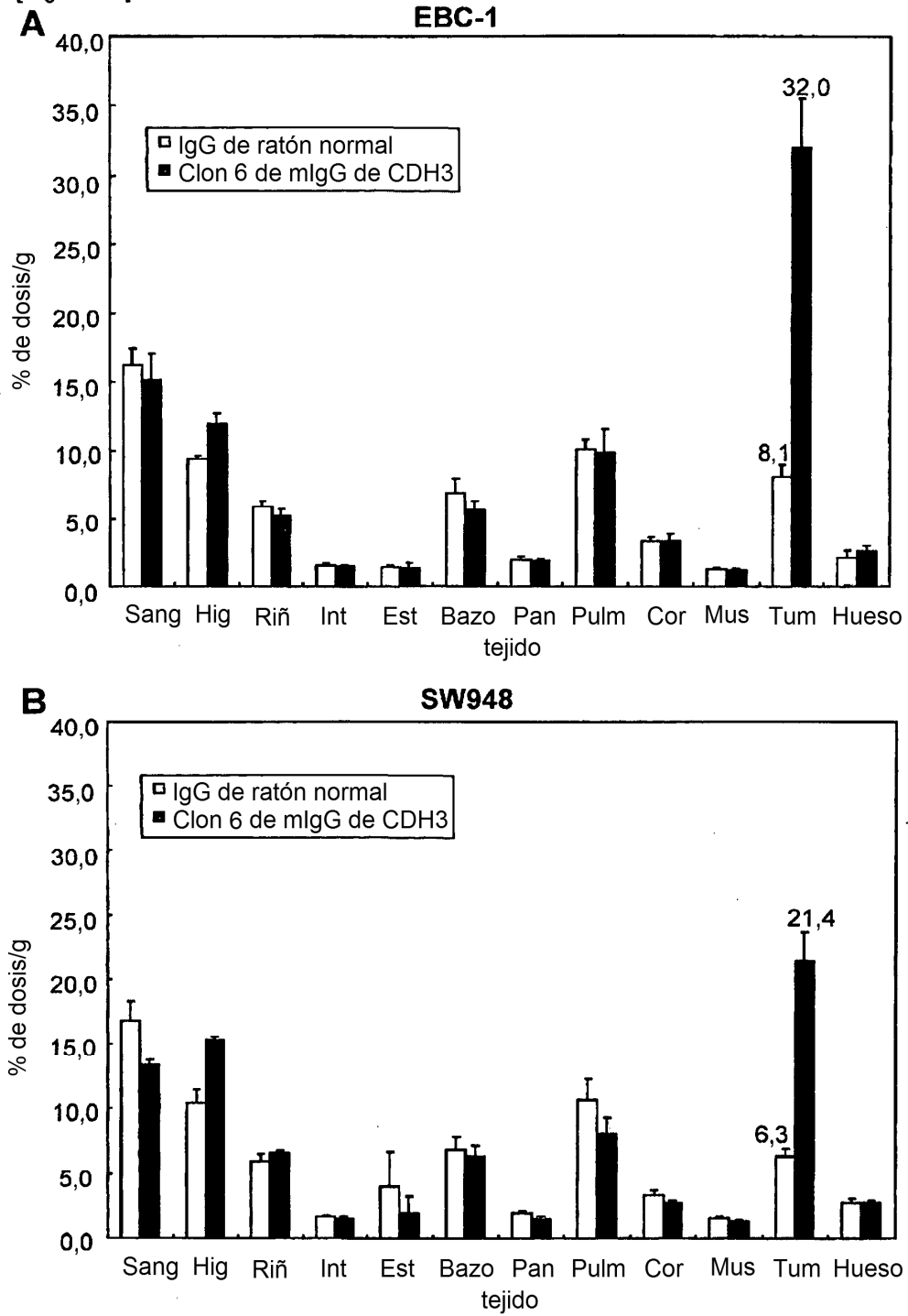
[Fig. 2C-D]



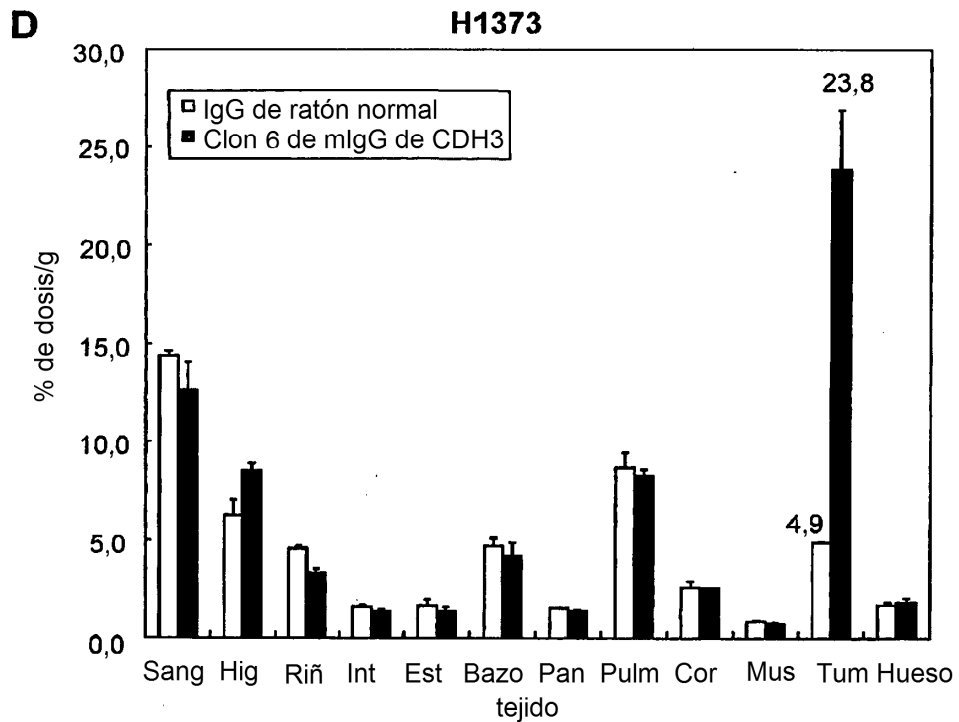
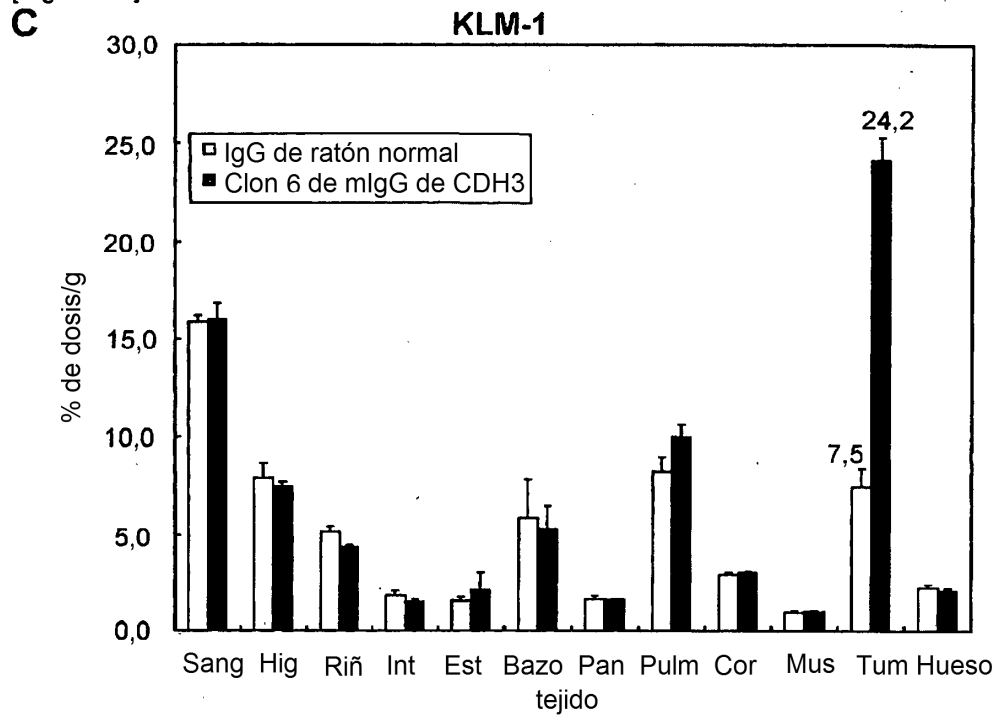
[Fig. 2E-F]



[Fig. 3A-B]



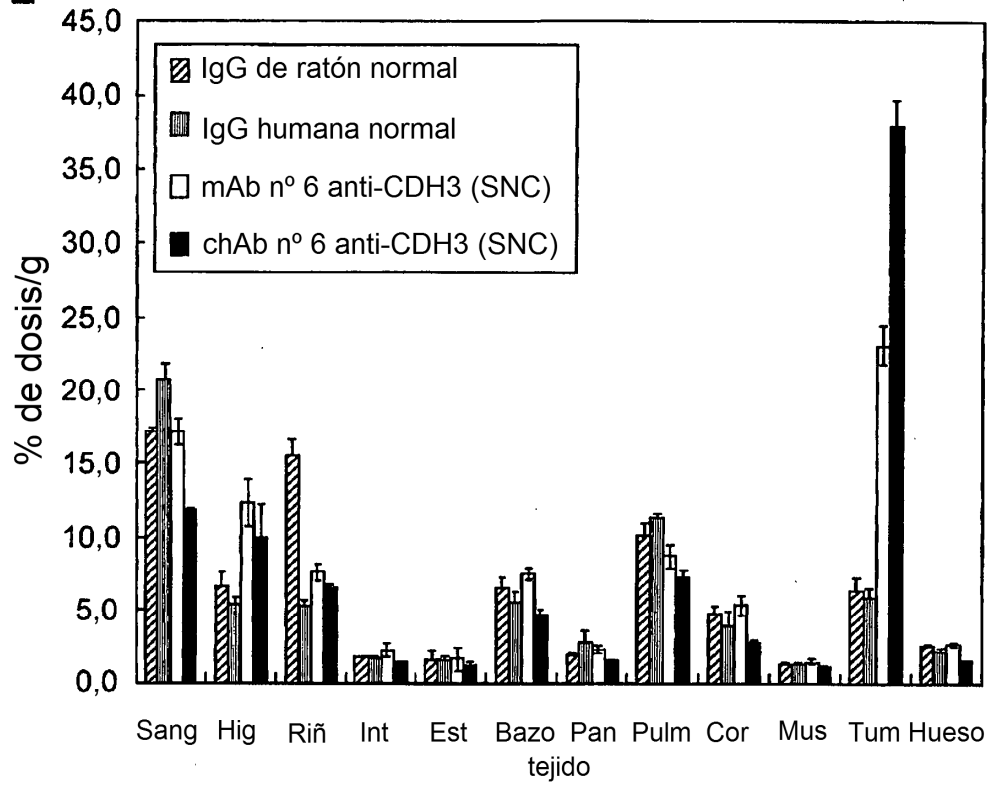
[Fig. 3C-D]



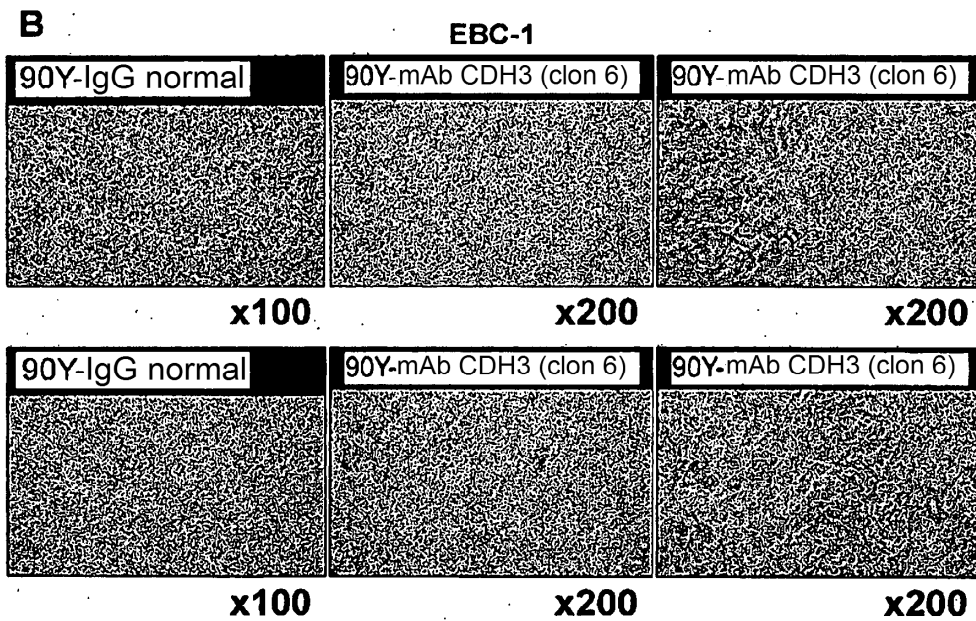
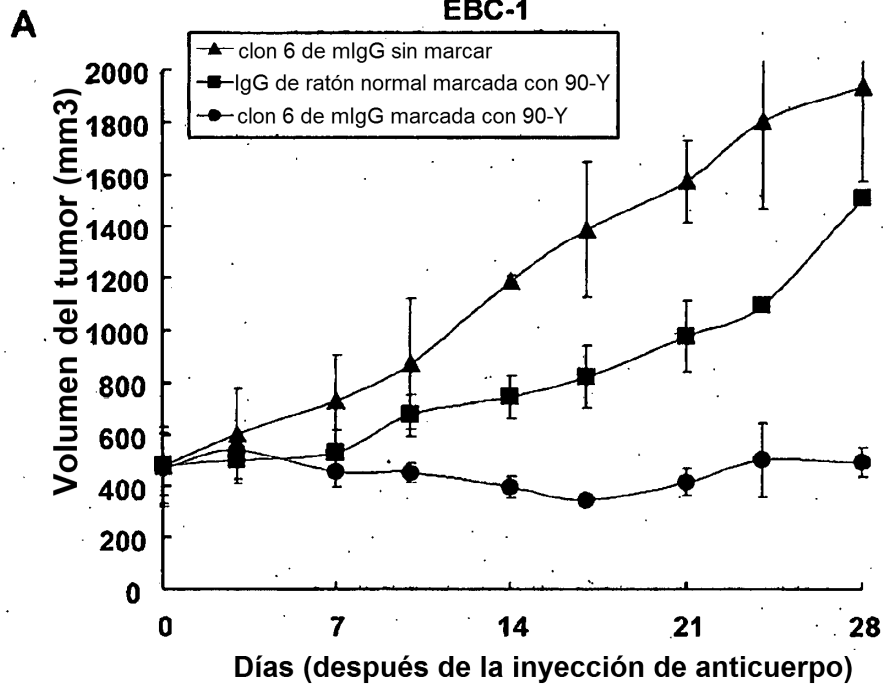
[Fig. 3E]

E

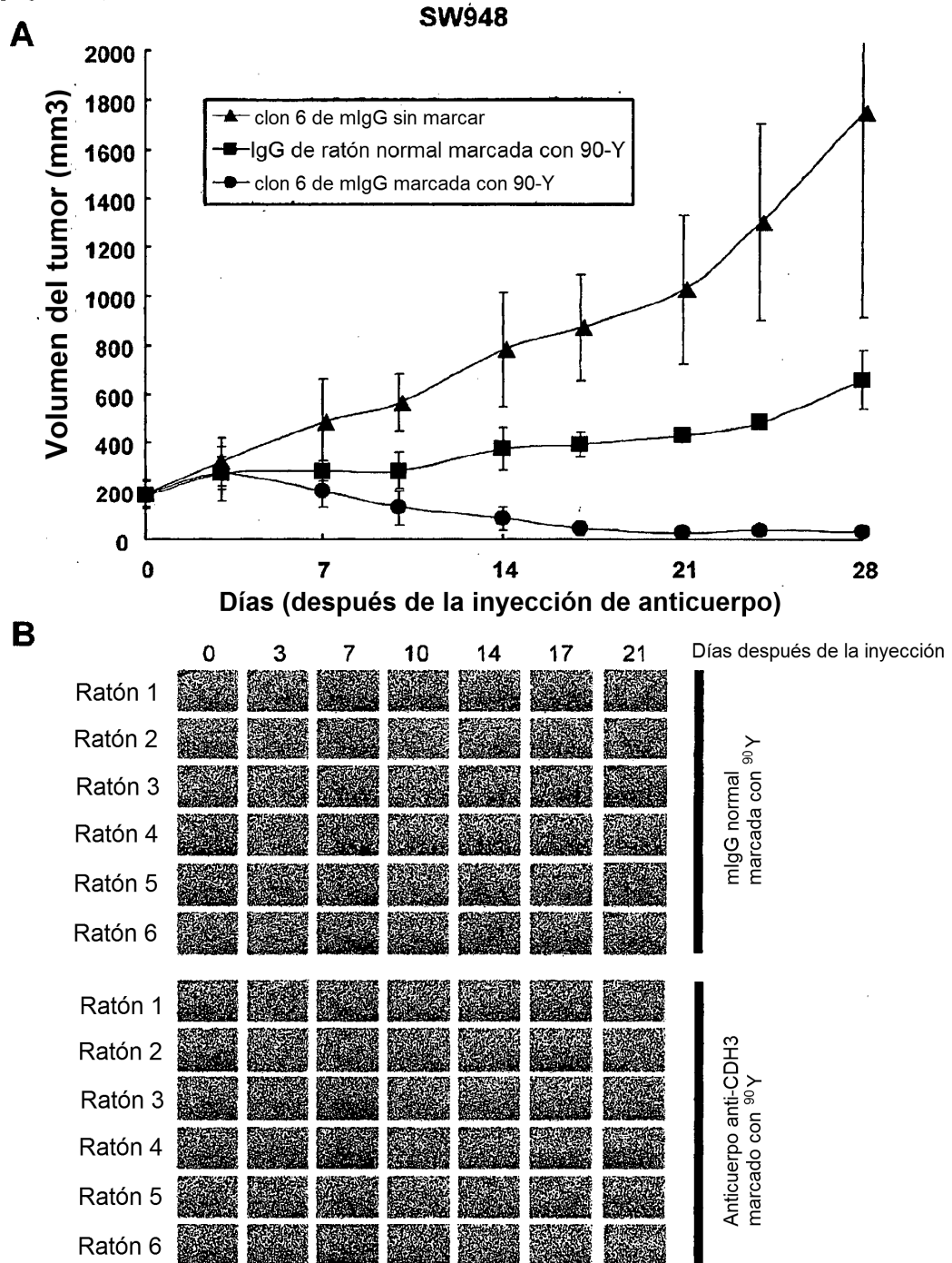
H1373



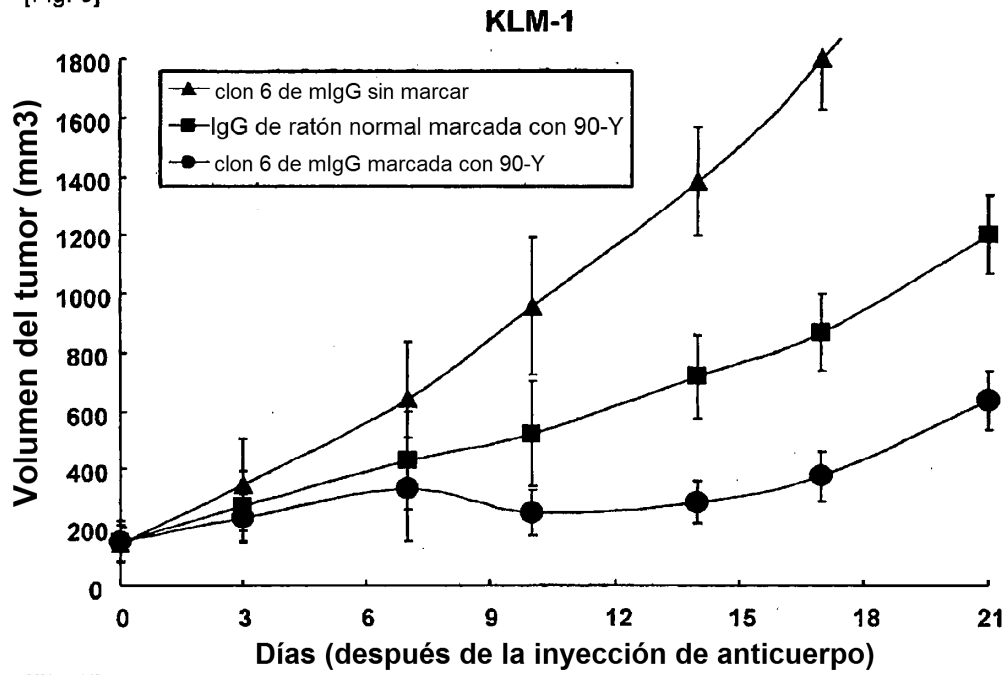
[Fig. 4A-B]



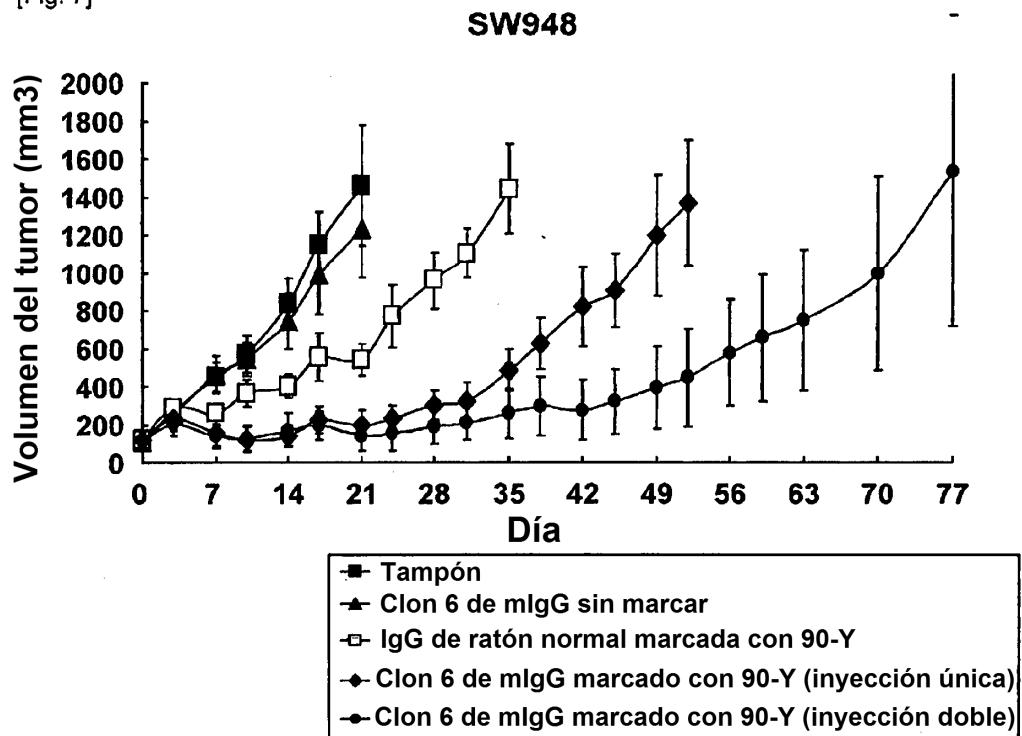
[Fig. 5A-B]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

