

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 907**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2007 E 07858965 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2193147**

54 Título: **Secuencias de nucleótidos y proteínas de un anticuerpo dirigido frente a un epítipo común para ferritinas humanas ácidas y básicas, anticuerpos monoclonales o moléculas semejantes a anticuerpo que comprenden estas secuencias y uso de éstos.**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2015

73 Titular/es:

**IMMUNE PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
15, Aba Even Avenue
46733 Herzliya-Pituach, IL**

72 Inventor/es:

**KADOUCHE, JEAN;
SABBAH-PETROVER, EMMANUELLE y
CHOSE, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 541 907 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

Secuencias de nucleótidos y proteínas de un anticuerpo dirigido frente a un epítipo común para ferritinas humanas ácidas y básicas, anticuerpos monoclonales o moléculas semejantes a anticuerpo que comprenden estas secuencias y uso de éstos.

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, a fragmentos de éstos y a moléculas semejantes a anticuerpo que reconocen un epítipo común para isoferritinas humanas ácidas y básicas. Estos anticuerpos anti-ferritina monoclonales quiméricos y humanizados, fragmentos de éstos y moléculas semejantes a anticuerpo pueden usarse en composiciones farmacéuticas para terapia para tomar como diana varias células cancerosas en un mamífero. También se describe un método para administrar anticuerpos anti-ferritina monoclonales, fragmentos de éstos y moléculas semejantes a anticuerpo a células linfáticas, células pancreáticas, células del endotelio linfático, y células hepáticas cancerosas, así como métodos para tratar cáncer pancreático, carcinomas hepatocelulares, sarcoma de Kaposi y linfoma de Hodgkin.

Antecedentes de la invención

15 Es muy conocido que el sistema inmune juega un papel en la progresión del cáncer. La inmunoterapia es un arma bastante nueva pero prometedora en el arsenal de tratamientos anticancerosos. La inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo aumentar la capacidad natural del cuerpo para defenderse frente a tumores malignos a través de la estimulación del sistema inmune del paciente mediante varios agentes farmacológicos tales como vacunas, infusiones de células T, infusiones de citoquinas o anticuerpos. Estos agentes farmacológicos pueden actuar estimulando una respuesta antitumoral incrementando el número de células efectoras, produciendo linfoquinas, disminuyendo mecanismos supresores, mejorando la tolerancia a fármacos citotóxicos o quimioterapia y/o alterando las células tumorales para incrementar su inmunogenicidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden actuar bien indirectamente reclutando células, lo que se conoce como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), o desencadenando directamente la muerte celular, lo que se conoce como toxicidad dependiente de complemento (CDC).

Un ejemplo de toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) es la inducida por rituximab, un anticuerpo quimérico que tiene como diana el antígeno CD20, expresado en un número significativo de malignidades de células B. La parte constante (Fc) del anticuerpo se une a los receptores Fc encontrados en monocitos, macrófagos y células asesinas naturales, lo que da lugar a la destrucción de las células tumorales. Los monocitos, macrófagos y células asesinas naturales pueden a su vez engullir las células tumorales unidas y destruirlas. Las células asesinas naturales también secretan citoquinas lo que da lugar a la muerte celular.

En la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), el anticuerpo monoclonal se une a su receptor en las células tumorales e inicia el sistema del complemento, que causa la permeación de la membrana celular dando lugar inevitablemente a la muerte celular.

35 En otro escenario más, los anticuerpos monoclonales pueden matar a las células bloqueando los mecanismos de crecimiento o desencadenando la apoptosis.

Por lo tanto, los anticuerpos pueden actuar de diferentes maneras para tratar el cáncer. Además, pueden usarse bien solos como se ha descrito anteriormente o pueden acoplarse a toxinas, agentes citotóxicos, fármacos, células inmunes asesinas o radioisótopos para administrar una sustancia o compuesto citotóxico a los sitios tumorales. Los ejemplos de radioisótopos que pueden usarse en radioinmunoterapia incluyen radioisótopos que emiten alfa o beta. Un ejemplo de una toxina conjugada a un anticuerpo para uso en terapia de anticuerpo es la exotoxina de pseudomonas. Los ejemplos de fármacos que pueden usarse incluyen agentes alquilantes, fármacos de platino, fármacos de pirimidina y semejantes.

45 Sin embargo, uno de los problemas encontrados con el uso de terapia de anticuerpo es que los anticuerpos pueden tomar como diana células que expresan un antígeno que puede estar presente tanto en células normales como cancerosas y así existe la posibilidad de reaccionar con células o tejidos normales. La reactividad cruzada con los tejidos normales o células normales puede dar lugar a resultados perjudiciales. Por lo tanto, se buscan generalmente los antígenos específicos de tumor o antígenos sobreexpresados en las células tumorales.

Aunque los anticuerpos monoclonales murinos se producen fácilmente y son generalmente funcionales, son reconocidos como antígenos extraños por un huésped humano y se producen anti-antígenos de ratón humanos (HAMA). Como se requiere la administración repetida de anticuerpos murinos, dicha administración puede causar efectos inflamatorios sistémicos. Para superar los problemas del uso de anticuerpos monoclonales murinos, se pueden generar anticuerpos humanos directamente a partir de seres humanos. Sin embargo, este proceso causa problemas éticos ya que no se puede pulsar a seres humanos con antígenos con el fin de producir anticuerpos. Además, no es fácil generar anticuerpos humanos frente a tejido humano. Así, se prefiere el uso de anticuerpos quiméricos o humanizados ya que incitan una respuesta menor que la respuesta de anticuerpo anti-ratón humana.

- Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que tienen regiones variables de una especie y regiones constantes de otra especie. Los ejemplos de anticuerpos quiméricos se describen en WO88/04936. Sin embargo, la generación de anticuerpos humanizados introduciendo secuencias humanas es muy difícil e impredecible. Esto se debe a la pérdida significativa de afinidad de unión del injerto de las regiones hipervariables y la alteración de la conformación de la región determinante de la complementariedad (CDR) por el marco humano. Además, aunque los anticuerpos quiméricos pueden generarse *in vitro*, los ensayos funcionales tales como ensayos CDC y ensayos ADCC no pueden predecir de forma inherente la capacidad *in vivo* de un anticuerpo quimérico de destruir o deplecionar las células diana que expresan un antígeno específico. Así, en muchos casos, no es predecible si un anticuerpo quimérico o humanizado puede funcionar de hecho apropiadamente para terapia de anticuerpo.
- La ferritina es una proteína de almacenamiento de hierro que tiene un peso molecular de 440.000. Está sobreexpresada en algunos tumores tales como cáncer de mama (Guner et al., "Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma." *Cancer Lett*, 67(2-3):103-112 (1992); Weinstein et al., "Tissue ferritin concentration and prognosis in carcinoma of the breast." *Breast Cancer Res Treat*; 14 (3):349-53 (1989)), linfoma de Hodgkin (Eshhar et al., "Ferritin, a Hodgkin's disease Associated Antigen." *PNAS U.S.A.*; 71 (10):3956-60 (1974)) y cáncer pancreático (Drysdale et al., "Human isoferritins in normal and disease states." *Semin Hematol*, 14 (1):71-88 (1977) Marcus et al., "Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoadsorbents." *Arch Biochem Biophys*, 162 (2):493-501 (1974)).
- Un suero antiferritina policlonal radiomarcado obtenido por inmunización de conejos con ferritina aislada del bazo de un paciente con enfermedad de Hodgkin mostró actividad antitumoral en pacientes con enfermedad de Hodgkin (Vriesendorp et al., "Radiolabelled immunoglobulin therapy in patients with Hodgkin's disease." *Cancer Biother Radiopharm*; 15 (5):431-45 (2000). Sin embargo, los anticuerpos policlonales tienen varios inconvenientes en comparación con los anticuerpos monoclonales tal como tamaño de lote limitado. De hecho, Vriesendorp y colegas notaron diferencias en las proporciones de respuesta en dos ensayos en pacientes con linfoma de Hodgkin cuando usaron dos lotes diferentes del anticuerpo antiferritina policlonal (Vriesendorp et al., "Review of five consecutive studies of radiolabeled immunoglobulin therapy in Hodgkin's disease." *Cancer Res*, 55 (23 Supl): 5888s-92s (1995). Así, son preferibles los anticuerpos monoclonales para uso en aplicaciones terapéuticas en lugar de anticuerpos policlonales por muchas razones.
- La Patente U.S. 7.153.506 describe el uso de anticuerpos anti-ferritina monoclonales murinos para tratar algunas formas de cáncer. Sin embargo, como se ha mostrado anteriormente existen problemas asociados con el tratamiento de seres humanos con anticuerpos monoclonales murinos (tales como producción de HAMA).
- WO01/52889 también describe anticuerpos monoclonales y policlonales que se unen a un epítipo común a ferritinas ácidas y básicas, y su uso en el tratamiento de células tumorales que sobreexpresan un gen de la familia myc. Sin embargo, WO01/52889 no identifica la estructura y secuencia del dominio de fijación de dichos anticuerpos monoclonales y policlonales a su o sus epítipos correspondientes.
- Sabbah et al. "In vitro and in vivo comparison of DTPA- and DOTA-conjugated antiferritin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer" (*Nuclear Medicine and Biology*, 2077, vol. 34, nº3, p 293-304) presentan resultados obtenidos del desarrollo preclínico de un anticuerpo antiferritina monoclonal IgG1 denominado AMB8LK, conjugado con ligandos quelantes bifuncionales y radiomarcado. Sin embargo, Sabbah et al. no identifican la estructura y secuencia del dominio de fijación de dicho anticuerpo monoclonal a su epítipo.
- El cáncer pancreático tiene un pronóstico muy malo con menos de un 5% de proporción de supervivencia a los cinco años. Ni la radiación con haz externo ni la quimioterapia, solas o en combinación, han proporcionado resultados prometedores hasta ahora. Hasta el 95% de los casos de cáncer pancreático surgen de la parte exocrina del páncreas, que es esa parte del páncreas que produce enzimas en las células acinares. La mayor parte del cáncer pancreático se encuentra en las células ductales. Por lo tanto, el término adenocarcinoma (semejante a conducto) se ha asignado a la causa más común de cánceres pancreáticos. Más de 60.000 europeos son diagnosticados con adenocarcinoma cada año. El periodo de supervivencia desde el momento del diagnóstico hasta el momento de la muerte es el peor de cualquier cáncer y generalmente es de aproximadamente 3 1/2 a 6 meses. La eliminación quirúrgica del tumor es una opción, pero sólo aproximadamente el 15% a 20% de los pacientes con cáncer pancreático son elegibles para cirugía.
- Además del cáncer pancreático, otros cánceres tales como linfoma de Hodgkin, cáncer de mama y carcinomas hepatocelulares también son cánceres que tienen altas proporciones de muerte y, para algunos de ellos, oportunidades limitadas de eliminación quirúrgica. Por ejemplo, en el carcinoma hepatocelular si el tumor es menor de 5 cm, existe en un solo lóbulo en el hígado y no hay invasión de la vasculatura hepática por el carcinoma, el tumor puede eliminarse quirúrgicamente. Sin embargo, la eliminación quirúrgica es imposible en muchos casos debido a la progresión no diagnosticada de la enfermedad.
- Existe una necesidad de un método para tratar los cánceres indicados anteriormente que no implique la intervención quirúrgica y que reduciría los efectos secundarios asociados con la quimioterapia.

Así, la presente solicitud describe composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo anti-ferritina quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como moléculas semejantes a anticuerpo que se unen a la ferritina humana ácida y básica para tratar determinados cánceres.

5 La presente solicitud también describe composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo anti-ferritina quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como moléculas semejantes a anticuerpo que pueden tratar cáncer pancreático, cáncer de mama, carcinomas hepatocelulares, sarcoma de Kaposi y linfoma de Hodgkin.

La presente solicitud también describe anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados que son específicos para la ferritina humana ácida y básica.

10 La presente solicitud también describe anticuerpos quiméricos o humanizados específicos para la ferritina humana ácida y básica que se unen a la ferritina humana.

La presente solicitud también describe métodos para tratar cánceres seleccionados del grupo de cáncer pancreático, cáncer de mama, carcinomas hepatocelulares, sarcoma de Kaposi y linfoma de Hodgkin mediante la administración de un anticuerpo anti-ferritina quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como moléculas semejantes a anticuerpo.

15 La presente solicitud también describe métodos para tratar cánceres seleccionados del grupo de cáncer pancreático, cáncer de mama, carcinomas hepatocelulares, sarcoma de Kaposi y linfoma de Hodgkin mediante la administración de un anticuerpo anti-ferritina quimérico o humanizado radiomarcado o fragmentos de éste así como moléculas semejantes a anticuerpo conjugadas con un quelante.

20 La presente solicitud también describe un método para administrar anticuerpos anti-ferritina humanizados o quiméricos a células linfáticas, células pancreáticas, células del endotelio linfático, y células hepáticas cancerosas.

La presente solicitud también describe el uso de un anticuerpo anti-ferritina quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como moléculas semejantes a anticuerpo para la preparación de un fármaco para tratar determinados cánceres tales como cáncer pancreático, cáncer de mama, carcinomas hepatocelulares, sarcoma de Kaposi y linfoma de Hodgkin.

25 La presente solicitud también describe el suministro de secuencias de ácido nucleico que pueden ponerse en vectores para producir todo o parte de un anticuerpo anti-ferritina quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como moléculas semejantes a anticuerpo de la presente invención mediante la producción en células.

Éstos y otros objetos de la presente solicitud serán evidentes a partir de la descripción, ejemplos o realizaciones preferidas siguientes.

30 Resúmen

En un aspecto, la presente solicitud describe un polipéptido de cadena única, que comprende desde el extremo N al extremo C, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26 (para formar un dominio VH). En otro aspecto, este polipéptido también comprende, en el extremo C de SEQ ID NO: 26, un dominio CH1 tal como SEQ ID NO: 6, así como una región Fc tal como SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 18, para formar una cadena pesada. En otro aspecto, la presente solicitud describe un polipéptido de cadena única que comprende, desde el extremo N al extremo C, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24, para formar un dominio VL. En otro aspecto, este polipéptido de cadena única también comprende, en el extremo C de SEQ ID NO: 24, una cadena kappa o lambda tal como SEQ ID NO: 12 para formar una cadena ligera.

40 En otro aspecto, la solicitud describe una molécula, que opcionalmente se une a ferritina humana tanto ácida como básica, que comprende una cadena ligera como se define en la presente memoria, una cadena pesada como se define en la presente memoria, o cualquier combinación de éstas. En otro aspecto más, dicha molécula es un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico que se une a ferritina humana tanto ácida como básica. En otro aspecto más, el anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico comprende las secuencias de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8 y 12, o SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 10 y 12.

45 En otro aspecto, la solicitud se refiere a un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico que se une a ferritina humana tanto ácida como básica que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 12 y 18.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, que se une a ferritina humana tanto ácida como básica, que comprende: (a) dos polipéptidos de cadena pesada, comprendiendo cada uno el dominio VH definido en SEQ ID NO: 4; y (b) dos polipéptidos de cadena ligera, comprendiendo cada uno el dominio VL como se define en SEQ ID NO: 2.

50 Según una realización particular, cada una de dichas cadenas pesadas comprende además una región constante CH1, que comprende opcionalmente una región Fc humana o una región Fc murina, y/o un péptido señal en dicho anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico. En dicha realización particular, dicho péptido señal puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16.

En otra realización particular, cada una de dichas cadenas ligeras comprende además una región constante kappa o lambda y/o un péptido señal en dicho anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico. En dicha otra realización particular, dicha región constante kappa o lambda puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 o dicho péptido señal puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14.

- 5 El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico de la invención puede comprender como una cadena ligera, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, y como una cadena pesada, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y una región Fc humana.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un fragmento funcional del anticuerpo de la invención, en el que dicho fragmento funcional es un fragmento Fv o un fragmento Fab y en el que dicho fragmento funcional se une específicamente a las ferritinas humanas tanto ácida como básica. En una realización particular, dicho fragmento está unido a un ligando, tal como citoquina, un receptor o cualquier proteína de interés.

15 La invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal biespecífico o trispecífico que comprende al menos un fragmento Fab como se ha definido anteriormente, en el que al menos un fragmento Fab consiste en un polipéptido que consiste desde el extremo N al extremo C de SEQ ID NO: 2 directamente unido a SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste desde el extremo N al extremo C de SEQ ID NO: 4 directamente unido a SEQ ID NO: 6.

20 La invención también se refiere a una molécula scFv que consiste en un dominio VH como se ha definido en SEQ ID NO: 4, unido a un dominio VL como se ha definido en SEQ ID NO: 2, en el que dicha molécula scFv se une a las ferritinas humanas tanto ácida como básica. La invención también se refiere a una molécula de fragmento divalente que comprende al menos un dominio VH como se ha definido en SEQ ID NO: 4 y al menos un dominio VL como se ha definido en SEQ ID NO: 2, en el que dicha molécula de fragmento divalente se une a las ferritinas humanas tanto ácida como básica.

25 También es parte de la invención un anticuerpo anti-ferritina monoclonal murino que se une a la ferritina humana tanto ácida como básica que comprende como una cadena ligera, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, y como una cadena pesada, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y una región Fc murina.

30 La invención también engloba una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico y una molécula scFv, un Bis-scFv que comprende al menos un scFv según la definición proporcionada anteriormente y un fragmento divalente según las definiciones proporcionadas anteriormente, que comprende además un radioisótopo conjugado con él. En una realización particular, dicho radioisótopo es un radioisótopo que emite alfa, beta, gamma, beta-gamma o alfa-beta.

35 La invención también engloba una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico y una molécula scFv, según las definiciones proporcionadas anteriormente, un Bis-scFv que comprende al menos un scFv según las definiciones proporcionadas anteriormente y un fragmento divalente según las definiciones proporcionadas anteriormente, que comprende además un fármaco conjugado con él. En una realización particular, dicho fármaco es un fármaco de pirimidina.

40 Otro aspecto más de la invención es una composición farmacéutica que comprende una molécula según la definición proporcionada en la presente memoria, especialmente un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico o humanizado que se une a ferritina humana tanto ácida como básica, fragmento de éste o moléculas semejantes a anticuerpo como se describe en la presente solicitud que se une a ferritina humana tanto ácida como básica como se describe en la presente memoria, y especialmente un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 y 12, o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 10 y 12, comprendiendo dicha composición además un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un fármaco de pirimidina.

45 La invención también engloba una composición farmacéutica que comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico o humano de la invención como se ha definido anteriormente, un fragmento funcional según las definiciones proporcionadas anteriormente, un anticuerpo monoclonal biespecífico o trispecífico según las definiciones proporcionadas anteriormente, una molécula scFv según las definiciones proporcionadas anteriormente, un Bis-scFv que comprende una molécula scFv según las definiciones proporcionadas anteriormente y un fragmento divalente según las definiciones proporcionadas anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 En otro aspecto más, se describe un método para la administración de un fármaco, materiales radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos a células que contienen ferritina básica y ácida, comprendiendo dicho método administrar una composición que comprende una cadena pesada, una cadena ligera, cualquier combinación de éstas, un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de éste o una molécula semejante a anticuerpo de la invención, y una composición seleccionada del grupo de un fármaco, materiales radiactivos, toxinas,

células inmunes asesinas y combinaciones de éstos en el que dicha composición está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto más de la presente descripción es un método para tratar un cáncer seleccionado del grupo de cáncer pancreático, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi y carcinoma hepatocelular comprendiendo dicho método administrar a un mamífero que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una cadena pesada, una cadena ligera, cualquier combinación de éstas, un anticuerpo quimérico o humanizado, un fragmento de éste o una molécula semejante a anticuerpo de la solicitud, especialmente una molécula que comprende SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8 y 12, o SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 10 y 12, y opcionalmente una composición seleccionada del grupo de un fármaco, isótopos radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas y combinaciones de éstos en el que dicha composición está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También es parte de la invención la composición definida anteriormente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que un fármaco, materiales radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos está unida mediante un agente quelante o conector al anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, fragmento funcional, anticuerpo monoclonal biespecífico o trispecífico, molécula scFv, Bis-scFv o fragmento divalente, para uso como un agente terapéutico.

También es parte de la invención la composición definida anteriormente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en combinación con una composición seleccionada del grupo de un fármaco, materiales radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas y combinaciones de éstos, en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi y carcinoma hepatocelular. También se describen una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 1 y 11 o un ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 3, 5 y 7 o SEQ ID Nos: 3, 5 y 9 o SEQ ID Nos: 3, 5 y 17, o una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7 y 11 o SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 9 y 11, o un ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 1, 11, 13 o un ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 3, 5, 7 y 15, o un ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 3, 5, 9 y 15 o un ácido nucleico que comprende SEQ ID Nos: 3, 5, 15 y 17, así como vectores que contienen al menos una de estas secuencias de ácido nucleico y células transformadas con al menos uno de estos vectores. También son parte de la presente solicitud un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 19, 21 y 23 y opcionalmente SEQ ID NO: 11 así como un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 29, 27 y 25 y opcionalmente SEQ ID NO: 5 y además opcionalmente SEQ ID NO: 7, NO: 9 o NO: 17.

La invención también engloba un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada como se ha definido anteriormente y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera como se ha definido anteriormente, y que comprende opcionalmente un promotor para expresión de baculovirus o un promotor eucariota. Según una realización particular de dicho vector, dicho ácido nucleico que codifica la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3 y en el que dicho ácido nucleico que codifica la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 1.

La invención también engloba células transformadas con un vector como se ha definido anteriormente, en el que dichas células se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, *E. coli*, células de levadura, células VERO, células HELA, células COS, células CR: 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, A549, PC12, K562, células 293, células Sf9 y células Cv1.

La invención también engloba células transformadas con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada como se ha definido anteriormente y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena ligera como se ha definido anteriormente, en particular seleccionadas del grupo que consiste en células CHO, *E. coli*, células de levadura, células VERO, células HELA, células COS, células CR: 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, A549, PC12, K562, células 293, células Sf9 y células Cv1.

Según una realización particular, dicho ácido nucleico que codifica la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3, y dicho ácido nucleico que codifica la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 1 en dichas células.

45 Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 es la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de VL del clon AMB8LK. El dominio VL está compuesto por la región FR1 (aminoácidos 1-26), la región CDR1 (aminoácidos 27-31), la región FR2 (aminoácidos 32-48), la región CDR2 (aminoácidos 49-51), la región FR3 (aminoácidos 52-87), la región CDR3 (aminoácidos 88-95) y la región FR4/J (aminoácidos 96-106).

La Fig. 2 es la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de VH del clon AMB8LK. El dominio VH está compuesto por la región FR1 (aminoácidos 1-25), la región CDR1 (aminoácidos 26-33), la región FR2 (aminoácidos 34-50), la región CDR2 (aminoácidos 51-58), la región FR3 (aminoácidos 59-95), la región CDR3 (aminoácidos 96-106) y la región FR4/J (aminoácidos 107-117).

La Fig. 3 es el ácido nucleico de CH1 (SEQ ID NO: 5) para la construcción Fab'2-3 cyst y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) para la construcción Fab'2-3 cyst. El CH1 se clonó a partir de una secuencia de ácido nucleico de gamma 1 constante humana, suplementado con una cisteína adicional y un codón de parada.

La Fig. 4 es la secuencia de ácido nucleico de la región constante gamma 1 humana (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma 1 humana (SEQ ID No: 8) (número de registro Genbank BC073782). El segundo codón TCC se modificó a AGC (subrayado) para crear un sitio de clonación *NheI*.

5 La Fig. 5 es la secuencia de ácido nucleico de la región constante gamma 4 humana (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma 4 humana (SEQ ID No: 10) (número de registro Genbank BC025985). El segundo codón TCC se modificó a AGC (subrayado) para crear un sitio de clonación *NheI*.

La Fig. 6 es la secuencia de ácido nucleico de la región constante kappa humana (SEQ ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana (SEQ ID No: 12).

10 La Fig. 7 es la secuencia de ácido nucleico de la secuencia del péptido señal de VL humano (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido señal de VL humano (SEQ ID No: 14).

La Fig. 8 es la secuencia de ácido nucleico de la secuencia del péptido señal de VH humano (SEQ ID NO: 15) y la secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido señal de VH humano (SEQ ID No: 16).

La Fig. 9A es la secuencia de ácido nucleico de la región constante de γ 2a murino (SEQ ID NO: 17).

La Fig. 9B es la secuencia de aminoácidos de la región constante de γ 2a murino (SEQ ID NO: 18).

15 La Fig. 10 es la estructura química de los quelatos usados en los ejemplos. A: *p*SCN-Bz-DTPA: ácido 2-(4-isotiocianatobencil)-diethylentriaminapentaacético. B: *p*SCN-Bz-CHX-A"-DTPA: ácido (R)-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(S,S)-ciclohexano-1,2-diamina-pentaacético; C: *p*SCN-Bz-DOTA: ácido 2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético.

20 La Fig. 11 es un gráfico que muestra la inmunoreactividad del anticuerpo conjugado frío por ELISA. Después de la conjugación de aproximadamente 3 quelatos por anticuerpo se realizó la evaluación de la inmunoreactividad de los inmunoconjugados por ELISA. Se inmovilizó ferritina pura a 5 μ g/ml en PBS, después se incubó con varias concentraciones de los inmunoconjugados. El control fue el AMB8LK no conjugado.

25 Las Figs. 12A, B y C son gráficos que muestran la biodistribución en ratones que portan tumor CAPAN-1 de ^{111}In -DTPA-AMB8LK y ^{111}In -DOTA-AMB8LK. Se inyectaron intravenosamente 0,2 MBq de Bz-DTPA-AMB8LK o Bz-DOTA-AMB8LK marcado con indio a ratones que portan tumor CAPAN-1. Los animales se sacrificaron a diferentes puntos de tiempo y los órganos se recogieron para recuento de actividad. Los datos se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por órgano (o por gramo de tejido para el tumor, sangre, músculo y hueso). Las barras de error representan SD, n= 4 por grupo. La abreviatura Intest significa intestino. El Grafico A es la distribución 24 horas después de la inyección. El Grafico B es la distribución 48 horas después de la inyección. El Grafico C es la distribución 72 horas después de la inyección.

30 Las Figs. 13A, B y C son gráficos que muestran la biodistribución en ratones que portan tumor CAPAN-1 de ^{90}Y -Bz-DTPA-AMB8LK y ^{90}Y -Bz-DOTA-AMB8LK. Se inyectaron intravenosamente 0,4 MBq de Bz-DTPA-AMB8LK o Bz-DOTA-AMB8LK marcado con itrio a ratones que portan tumor CAPAN-1. Los animales se sacrificaron a diferentes puntos de tiempo y los órganos se recogieron para recuento de actividad. Los datos se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por órgano (o por gramo de tejido para el tumor, sangre, músculo y hueso). Las barras de error representan SD, n= 4 por grupo. La abreviatura Intest significa intestino. El Grafico A es la distribución 24 horas después de la inyección. El Grafico B es la distribución 48 horas después de la inyección. El Grafico C es la distribución 120 horas después de la inyección.

35 La Fig. 14 son tres imágenes de un ratón que porta tumor CAPAN-1 al que se inyectó ^{111}In -DOTA-AMB8LK. Se inyectó intravenosamente a un ratón desnudo que porta tumor CAPAN-1 20 MBq de ^{111}In -DTPA-AMB8LK y se obtuvieron imágenes a diferentes puntos de tiempo. Esta figura muestra los escaneos hechos 1, 24 y 72 horas después de la inyección. Se aplicó la misma escala de niveles de radiactividad a las tres imágenes pero teniendo en cuenta la desintegración del indio, el nivel de radiactividad en el tumor después de 72 horas es superior al de después de 24 horas.

45 La Fig. 15 es un diagrama del anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Descripción breve de las secuencias

Las secuencias (SEQ ID) usadas en la presente solicitud son las siguientes:

Nombre	Nucleótido SEQ ID	Proteína SEQ ID
dominio VL del clon AMB8LK	1	2
dominio VH del clon AMB8LK	3	4
dominio CH1 (construcción Fab'2-3 cyst)	5	6
región constante gamma 1 humana	7	8
región constante gamma 4 humana	9	10
región constante kappa humana	11	12
péptido señal de VL	13	14
péptido señal de VH	15	16
región constante de γ 2a murino	17	18
dominio CDR1 de VL	19	20
dominio CDR2 de VL	21	22
dominio CDR3 de VL	23	24
dominio CDR3 de VH	25	26
dominio CDR2 de VH	27	28
dominio CDR1 de VH	29	30
dominio FR1 de VH	31	32
dominio FR2 de VH	33	34
dominio FR3 de VH	35	36
dominio FR4 de VH	37	38
dominio FR1 de VL	39	40
dominio FR2 de VL	41	42
dominio FR3 de VL	43	44
dominio FR4 de VL	45	46

Descripción de las realizaciones preferidas

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "que consiste esencialmente en" cuando se usa en conexión con ácidos nucleicos o aminoácidos significa que otros ingredientes o moléculas menores pueden estar presentes con las secuencias de aminoácidos o ácido nucleico. La secuencia de ácido nucleico tiene la misma longitud exacta que la indicada en el número de identificación de secuencia, pero puede tener 3 a 12 nucleótidos más o menos en los extremos N y C. Asimismo, la secuencia de aminoácidos tiene la misma longitud exacta que la indicada en el
- 10 número de identificación de secuencia pero pueden añadirse o deleccionarse 1 a 4 aminoácidos más o menos en los extremos N o C. Esos aminoácidos extra o deleccionados no modifican la unión y/o la actividad del anticuerpo monoclonal quimérico a ferritina.

- Tal y como se usa en la presente memoria, el término "agente quelante" significa cualquier sustancia química que forma un complejo con un metal para formar un quelato. Los agentes quelantes son compuestos orgánicos que son
- 15 capaces de formar enlaces coordinados o iónicos con metales a través de dos o más átomos del compuesto orgánico.

El término "mamífero" engloba cualquiera de los diferentes animales vertebrados de sangre caliente de la clase Mammalia, incluyendo seres humanos, caracterizados por un recubrimiento de pelo en la piel y, en las hembras, glándulas mamarias productoras de leche para alimentar a los pequeños. En una realización particular, la descripción se refiere a un mamífero no humano.

5 El término "anticuerpo quimérico" y "anticuerpo humanizado" se refieren a un anticuerpo cuyas regiones derivan de dos especies diferentes, generalmente murino y humano. El término "anticuerpo quimérico" se usa específicamente para hacer referencia a una región variable (compuesta por una VL y VH y responsable de la unión del antígeno) de una primera especie, tal como un ratón con la región constante de una segunda especie, tal como un ser humano. La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere al injerto de regiones determinantes de la complementariedad
10 (CDR) de una primera especie, tal como ratón, en regiones marco (FR) humanas.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una proteína de unión a antígeno que tiene cuatro cadenas polipeptídicas que consisten en dos cadenas pesadas y dos ligeras. Las cadenas, que están estabilizadas por enlaces disulfuro intercadena, tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Tanto las cadenas pesada como ligera están plegadas en dominios, que es la región globular de la cadena pesada o ligera que contiene bucles
15 peptídicos. Los dominios son bien "constantes" o "variables" dependiendo de la cantidad de variación en la secuencia. Los dominios constantes en la cadena ligera se refieren como regiones constantes de cadena ligera o CL. Los dominios constantes en la cadena pesada se refieren como regiones constantes de cadena pesada o CH. Los dominios variables en la cadena ligera se refieren como regiones variables de cadena ligera o dominio VL, mientras los dominios pesados en las cadenas variables se refieren como regiones variables de cadena pesada o
20 dominio VH. Cada dominio variable (VH o VL) consiste en CDR (región determinante de la complementariedad) y FR (región marco), que se unen alternativamente entre sí, es decir, desde el extremo N al extremo C: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La expresión "anticuerpo monoclonal" engloba:

(1) anticuerpos monoespecíficos, es decir, moléculas en las que los dos sitios de unión a antígeno (dominios formados por la interacción de las regiones VH y VL como se define en la presente memoria, y que interactúan con el antígeno) reconocen y se unen al mismo antígeno (por ejemplo, un antígeno común a las ferritinas humanas ácida y básica). En este aspecto, las dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras como se define en la presente memoria (o al menos las dos VH y dos VL como se define en la presente memoria) tienen la misma secuencia de aminoácidos;

(2) anticuerpos trifuncionales, es decir, moléculas biespecíficas como se describe en la presente memoria más adelante y que tienen además una región Fc (dominios CH2 y CH3) de cualquier origen, particularmente de origen humano.

El término "molécula semejante a anticuerpo" se refiere a una molécula que tiene todo o parte de los dominios variables pesados y ligeros del anticuerpo AMB8LK, y que no tienen la estructura convencional de un anticuerpo de cuatro cadenas, pero conserva la capacidad de interactuar y unirse con el antígeno (ferritina). En una realización particular, las moléculas semejantes a anticuerpo descritas en la presente memoria comprenden las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios VL y/o VH del anticuerpo AMB8LK. Esto engloba:

(1) scFv, es decir, un dominio VH como se define en la presente memoria genéticamente asociado (opcionalmente mediante un conector) con un dominio VL como se define en la presente memoria, así como moléculas que comprenden al menos un scFv, tal como moléculas Bis ScFv (teniendo dos ScFv la misma unión o diferente a antígeno unidos entre sí (opcionalmente mediante un conector));

(2) moléculas de fragmentos divalentes es decir, el dominio variable de cadena pesada derivado de un primer anticuerpo (un primer dominio VH (VH1) tal como uno definido en la presente memoria) conectado con el dominio variable de cadena ligera derivado de un segundo anticuerpo (VL2) en la misma cadena polipeptídica (VH1-VL2) conectado por un conector peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, interactuando con el dominio variable de cadena pesada de derivado de un segundo anticuerpo (VH2) conectado con el dominio variable de cadena ligera derivado de un primer anticuerpo (un primer dominio VL (VL1) tal como uno definido en la presente memoria) en la misma cadena polipeptídica (VH2-VL1), en el que VL1 y VH1 forman un primer sitio de unión a antígeno (que reconoce y/o se une a un antígeno común a ferritina humana ácida y básica) y VL2 y VH2 forman un segundo sitio de unión a antígeno (que reconoce y/o se une a un antígeno y/o epítipo similar o diferente del primer sitio de unión a antígeno);

(3) moléculas biespecíficas, es decir, que los dos sitios de unión a antígeno de un fragmento Fab₂ (dominios variable y CH1 de cadenas ligera y pesada) interactúan con diferentes antígenos (o epítopos). En este aspecto, las dos cadenas pesadas (o los dos dominios VH) tienen una secuencia de aminoácidos diferente, y/o las dos cadenas ligeras (o los dos dominios VL) tienen una secuencia de aminoácidos diferente. En las moléculas biespecíficas de la invención, al menos uno de los dos sitios de unión a antígeno es un sitio de unión a ferritina que consiste en un dominio VL o VH como se define en la presente memoria, tal como respectivamente SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 o variantes de éstas;

(4) moléculas trispecíficas, es decir, que los dos sitios de unión a antígeno de un fragmento Fab₃ (dominios variable y CH1 de cadenas ligera y pesada) interactúan con diferentes antígenos (o epítomos). En este aspecto, las tres cadenas pesadas (o a los tres dominios VH) tienen una secuencia de aminoácidos diferente, y/o las tres cadenas ligeras (o los tres dominios VL) tienen una secuencia de aminoácidos diferente. En las moléculas tri-específicas de la invención, al menos uno de los tres sitios de unión a antígeno es un sitio de unión a ferritina que consiste en un dominio VL o VH como se define en la presente memoria, tal como respectivamente SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 o variantes de éstas;

(5) V_{HH} (dominio VH desprovisto de cadena ligera), es decir, un dominio VH como se define en la presente memoria que tiene la capacidad de interactuar como tal con el antígeno, sin la presencia de un dominio variable ligero (VL). Estos V_{HH} pueden obtenerse por técnicas recombinantes o por purificación de animales de la familia de los camélidos o de tiburones.

Por "región constante" se quiere decir los dominios CH1, CH2 y CH3 (formando CH2 y CH3 la región Fc). En los anticuerpos monoclonales de la presente descripción, el dominio constante murino CH1 y los dominios constantes murinos CH2 y CH3 están reemplazados, independientemente uno de otro, con la región constante humana CH1 y las regiones constantes humanas CH2 y CH3. Por lo tanto, en una realización, los dominios CH2 y CH3 (región Fc) de un anticuerpo monoclonal murino están reemplazados por una regiones CH2 y CH3 de origen humano. La región Fc humana puede ser una cadena mu, gamma, alfa, delta o épsilon, derivada opcionalmente de inmunoglobulinas humanas. En una realización particular, la región Fc humana se selecciona de IgG1 e IgG4. En otra realización, el dominio CH1 de un anticuerpo monoclonal está reemplazado por una región CH1 humana, tal como cadenas kappa o lambda, derivadas opcionalmente de inmunoglobulinas humanas,

Por "fragmento funcional" se quiere decir un fragmento de anticuerpo monoclonal, que retiene sus propiedades de unión para unirse específicamente a ferritina humana tanto ácida como básica. En otro aspecto, "fragmento funcional" engloba un anticuerpo monoclonal que presenta la misma o sustancialmente la misma afinidad y avidéz de unión que el anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico no fragmentado o anticuerpo monoclonal parental. La afinidad de unión del fragmento funcional de anticuerpo monoclonal no debe ser menor de 10% del anticuerpo parental. En otro aspecto, la afinidad de unión del fragmento de anticuerpo monoclonal no debe ser menor de 25% del anticuerpo parental. En otro aspecto, la afinidad de unión del fragmento de anticuerpo monoclonal no debe ser menor de 30% o no menor de 50% del anticuerpo parental. Los métodos para medir la afinidad de unión son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de competición, análisis Scatchard y ensayos de unión mitad de la máxima.

Por el término "variante" cuando se hace referencia a las variantes de secuencia quiere decir secuencias que tienen un grado de similitud de al menos 90%, 95% ó 98% de similitud con SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 y 46, usando programas de comparación de secuencias sensibles y rápidos tales como BLAST, FASTA, GAP, BESTFIT, clustalW o cualquier otro programa relevante.

Claramente, las secuencias de aminoácidos con una identidad específica definida anteriormente tienen una mayoría de sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones de aminoácidos de la misma clase. Estas clases comprenden, por ejemplo, aminoácidos que tienen cadenas laterales polares no cargadas, tales como Asn, Gln, Ser, Thr o Tyr; aminoácidos que contienen cadenas laterales básicas, tales como His, Lys o Arg; aminoácidos que contienen cadenas laterales ácidas, tales como Glu o Asp y aminoácidos que contienen cadenas laterales no polares, tales como Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Phe, Cys o Trp.

Por ejemplo, respecto a la Figura 4, la Asn en la posición de aminoácido 42 puede sustituirse con Gln, Ser, Thr o Tyr; la Lys en la posición de aminoácido 11 puede modificarse a His o Arg; la Ala en la posición de aminoácido 7 puede reemplazarse por Gly Leu, Val, Ile, Phe, Cys o Trp. Asimismo, las sustituciones conservativas pueden hacerse a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la presente invención de la misma manera. Se apreciará que el experto en la técnica asegurará que una vez que se hacen estas sustituciones a la secuencia o secuencias de proteína, se retiene la actividad de unión a ferritina humana. Esto puede conseguirse usando los ensayos RIA y ELISA descritos en los ejemplos.

El término "epítomo" se refiere al sitio del antígeno al que se une específicamente el anticuerpo. Un epítomo tiene al menos 3 a 15 aminoácidos en una conformación única (epítomo lineal o conformacional). Puede usarse cristalografía con rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional o mapeo de epítomos como métodos para determinar la conformación espacial de los epítomos.

Los anticuerpos que reconocen el mismo epítomo pueden identificarse por un ensayo de unión competitiva, que se conoce en la técnica. Los ejemplos de ensayos de unión competitiva incluyen RIA y ELISA.

El término "dosificación efectiva" o "dosis efectiva" significa la cantidad suficiente para conseguir o al menos conseguir parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente efectiva" es una cantidad que es suficiente para tratar la enfermedad. Las cantidades de la dosis dependerán del tipo de cáncer que se va a tratar, así como de los estadios del cáncer (I-IV).

Por "administración a determinados intervalos" se quiere decir, por ejemplo, que el anticuerpo monoclonal quimérico o molécula semejante a anticuerpo de la presente invención puede administrarse en primer lugar, seguido de la administración de los fármacos, radioisótopos, toxinas o células inmunogénicas asesinas a un intervalo posterior; es decir, 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 24 horas después. También incluye una situación en las que los fármacos, radioisótopos, toxinas o células inmunogénicas asesinas se administran en primer lugar y el anticuerpo monoclonal quimérico de la presente invención se administra a un intervalo posterior; es decir, 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 24 horas después.

La presente solicitud describe nuevos anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, fragmentos de éstos o moléculas semejantes a anticuerpo que se unen a ferritina humana tanto ácida como básica y su uso como agentes terapéuticos bien solos, o con fármacos, radioisótopos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos simultáneamente o en determinados periodos de tiempo o conjugados con fármacos, radioisótopos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos. La presente solicitud describe además secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, fragmentos de éstos o moléculas semejantes a anticuerpo y su expresión en huéspedes recombinantes.

Más específicamente, la presente invención está dirigida a anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, fragmentos de éstos o moléculas semejantes a anticuerpo que se unen específicamente a ferritina humana tanto ácida como básica y derivan de partes del anticuerpo murino AMB8LK.

El anticuerpo murino AMB8LK es un anticuerpo murino que se obtuvo según el procedimiento de Kadouche et al Analysis of various isoferitins with monoclonal antibodies." CR Seances Acad Sci III: 295 (6) 443-448 (1982). Básicamente, después de inmunizar ratones Balb/c hembras con ferritina extraída de bazo humano, las células del bazo de los mejores respondedores se fusionaron con células de mieloma murino Sp20 usando polietilén glicol 4000 según protocolos estándar y los hibridomas seleccionados se clonaron, expandieron y cultivaron *in vitro*. AMB8LK se seleccionó por su alta afinidad de $5,1 \times 10^{-9}$ M, y su especificidad para ferritina humana.

Sin embargo, aunque el anticuerpo murino AMB8LK posee propiedades funcionales que lo hacen adecuado como un agente terapéutico, también es reconocido como un anticuerpo extraño en los seres humanos y por lo tanto se elimina rápidamente de la circulación. Por lo tanto, se requieren dosis más altas del anticuerpo monoclonal murino para el paciente que se va a tratar. Esto puede resultar en que el paciente tenga efectos inflamatorios sistémicos.

Por lo tanto, la presente invención resuelve el problema asociado con anticuerpos monoclonales murinos proporcionando, anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, fragmentos de éstos o moléculas semejantes a anticuerpo que tienen las regiones variables pesadas y variables ligeras del anticuerpo monoclonal murino AMB8LK. En una realización particular, se describe un anticuerpo monoclonal quimérico que comprende las regiones variables pesadas y variables ligeras del anticuerpo monoclonal murino AMB8LK, una región constante pesada 1 de Fab' 2-3 cisteína humano, una región constante ligera kappa humana y regiones de cadena pesada constante humana de IgG1 o IgG4 humana.

En un primer aspecto, se describe un polipéptido que comprende, desde el extremo N al extremo C, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26 (para formar un dominio VH) o un polipéptido que comprende, desde el extremo N al extremo C, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24 (para formar un dominio VL). En una realización particular, aplicada a ambos, pero independientemente, los dominios VH y VL, las diferentes SEQ ID no son contiguas, es decir, que cada SEQ ID está separada de la(s) otra(s) por residuos de aminoácidos adicionales. Estos residuos de aminoácidos adicionales pueden ser de origen murino o en el caso del diseño de un anticuerpo humanizado pueden derivar de una fuente humana, especialmente inmunoglobulina humana. En este último caso, las SEQ ID NOs 30, 28 y 26 y/o SEQ ID Nos: 20, 22 y 24 se injertan en un soporte humano (tal como dominios VH o VL humanos) reemplazando así sus equivalentes humanos. Por lo tanto, la solicitud está dirigida a dominios VL y VH de origen murino así como dominios VL y VH que tienen CDR de origen murino y marco de origen humano (también denominado humanizado o injertado con CDR).

En un aspecto particular, el dominio VH tiene la fórmula siguiente:

ExtremoN.AAn-SEQ ID NO: 30-AAm-SEQ ID NO: 28-AAp-SEQ ID NO: 26-AAq.ExtremoC,

en la que "-" representa un enlace peptídico, AA representa cualquier aminoácido, y n es igual a 25 ó 26, m es un número entero comprendido entre 15 a 19, preferiblemente 17, p es un número entero comprendido entre 35 y 40 y q es un número entero comprendido entre 10 y 12, preferiblemente 11. AAn, AAm, AAP y AAq corresponden respectivamente a las regiones FR1, FR2, FR3 y FR4 de un dominio variable pesado, y pueden ser de origen murino o humano. En una realización particular, AAn, AAm, AAP y AAq son respectivamente, e independientemente una de otra, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 38.

	Secuencia de nucleótidos (SEQ ID)	Secuencia de proteína (SEQ ID)
AA_n	caggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcac cctcacagagcctgtccatcacatgcactgtctct (31)	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVS (32)
AA_m	gtacaactgggttcgccagcctccaggaaagggctctggagt ggctgggaacg (33)	VHWVRQPPGKGLEWLG (34)
AA_p	gactataactcagttctcaaatccagactgagcatcagca aggacaactccaagagccaagttttgttaaaagtgaacag tctacaaactgatgacacagccatatattactgt (35)	DYNSVLKSRLSISKDNSKSQLLKV NSLQTDITAIYYC (36)
AA_q	tggggtcaaggaacctcagtcaccgtctctca (37)	WGQGTSVTVSS (38)

En una realización particular, el dominio VH consiste esencialmente en SEQ ID NO: 4.

En un aspecto particular, el dominio VL tiene la fórmula siguiente:

ExtremoN.AAr-SEQ ID NO: 20-AA_s-SEQ ID NO: 22-AA_t-SEQ ID NO: 24-AA_v.ExtremoC,

- 5 en la que "-" representa un enlace peptídico, AA representa cualquier aminoácido, y r es igual a 25 ó 26, s es un número entero comprendido entre 15 a 19, preferiblemente 17, t es un número entero comprendido entre 35 y 40 y y es un número entero comprendido entre 10 y 12, preferiblemente 11. AAr, AA_s, AA_t y AA_v corresponden respectivamente a las regiones FR1, FR2, FR3 y FR4 de un dominio variable ligero, y pueden ser de origen murino o humano. En una realización particular, AAr, AA_s, AA_t y AA_v son respectivamente, e independientemente una de
10 otra, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46:

	Secuencia de nucleótidos (SEQ ID)	Secuencia de proteína (SEQ ID)
AA_r	caaattgttctcaccagctctccagcaatcctgtctgcat ctctaggggaggagatcacctaacctgcagtgccagc (39)	QIVLTQSPAILSASLGEEITLT CSAS (40)
AA_s	atgcaactggtagcagcagaagtcaggcacttctcccaaac tcttgatttat (41)	MHWYQQKSGTSPKLLIY (42)
AA_t	aacctggcttctggagtcctctctcgcttcagtgccagtg ggctctgggacctttattctctcacaatcagcagtggtgga ggctgaagatgctgcccattattactgc (43)	NLAGVPSRFSGSGSGTFYSLTISS VEAEDAADYYC (44)
AA_v	ttcggctcggggacaaagttgaaataaac (45)	FGSGTKLEIK (46)

En una realización particular, el dominio VL consiste esencialmente en SEQ ID NO: 2.

- 15 En una realización particular, un polipéptido que comprende un dominio VL como se ha definido anteriormente, tal como SEQ ID NO: 2 también comprende una cadena kappa o lambda, tal como SEQ ID NO: 12, para formar una cadena ligera. Así, la parte C-terminal del dominio VL está unida genéticamente a la parte N-terminal de SEQ ID NO: 12, posiblemente mediante una secuencia conectora. En un aspecto particular, el dominio VL de la invención está unido en su parte N-terminal a un péptido señal tal como uno que tiene SEQ ID NO: 14.

- 20 En otro aspecto, un polipéptido que comprende un dominio VH de la invención tal como SEQ ID NO: 4 también comprende una región constante CH1, tal como SEQ ID NO: 6. Así, la parte C-terminal del dominio VH está unida genéticamente a la parte N-terminal de SEQ ID NO: 6, posiblemente mediante una secuencia conectora. En una realización particular, una secuencia que comprende un dominio VH (tal como SEQ ID No: 4) y SEQ ID NO: 6 también comprende una región Fc humana, tal como SEQ ID Nos 8 ó 10 o una región Fc murina tal como SEQ ID No: 18, para formar una cadena pesada. En ese caso, la SEQ ID NO: 8, 10 ó 18 está unida genéticamente por su parte N-terminal a la parte C-terminal de SEQ ID NO: 6. Independientemente o en combinación con las realizaciones
25 anteriores, el dominio VH puede estar unido en su parte N-terminal a un péptido señal tal como uno que tiene SEQ ID NO: 16.

Las cadenas ligera y pesada particulares descritas en la presente solicitud son:

- un polipéptido de cadena ligera que comprende desde el extremo N al extremo C, un dominio VL de la invención, especialmente SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, y

- un polipéptido de cadena pesada que comprende desde el extremo N al extremo C, un dominio VH, tal como SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y una región Fc humana, tal como una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 18.

5 Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico de cuatro cadenas que comprende dos cadenas ligeras que comprenden al menos un dominio ligero variable (VL) de la invención, de origen murino o que tiene CDR de origen murino y marco de origen humano, y particularmente el dominio ligero variable como se define en SEQ ID NO: 2 o una variante de ésta, y dos cadenas pesadas que comprenden al menos un dominio pesado variable (VH) de la invención, de origen murino o que tiene CDR de origen murino y marco de origen humano, y particularmente el dominio pesado variable como se define en SEQ ID NO: 4 o una variante de ésta. La combinación de estos dominios VH y VL forma el sitio de unión a ferritina. En una realización particular, el dominio ligero variable del anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico es el que se define como SEQ ID NO: 2 y/o el dominio pesado variable del anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico es el que se define como SEQ ID NO: 4.

15 En un aspecto particular de la descripción, un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico comprende, además de dominios ligeros y pesados variables de la invención (tales como SEQ ID Nos 2 y 4, respectivamente), al menos una región constante humana CH1, tal como una secuencia de SEQ ID NO: 6 y/o una región lambda o kappa, tal como SEQ ID NO: 12. Por lo tanto, SEQ ID NO: 6 está unida genéticamente al dominio pesado variable (tal como SEQ ID NO: 4) y/o SEQ ID NO: 12 está unida genéticamente al dominio ligero variable (por ejemplo, SEQ ID NO: 2).

20 Además de los dominios ligero y pesado derivados de la región variable de AMB8LK, el anticuerpo monoclonal quimérico de la presente solicitud también puede incluir la región pesada constante 1 de Fab'2-3 cyst de SEQ ID NO: 6, así como la región constante ligera kappa humana de SEQ ID NO: 12 y una región Fc constante pesada, tal como la región constante gamma 1 humana (SEQ ID No: 8) o la región constante gamma 4 humana (SEQ ID NO: 10) o la región constante γ 2a murina (SEQ ID NO: 18).

25 La solicitud también se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado en el que las cadenas ligeras son un híbrido de CDR murina y FR humana, y/o las cadenas pesadas son un híbrido de CDR murina y FR humana. En otro aspecto, el anticuerpo monoclonal humanizado consiste en:

- dos cadenas ligeras humanas en las que la CDR1, CDR2 y CDR3 se han reemplazado respectivamente por SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24, y/o

- dos cadenas pesadas humanas en las que la CDR1, CDR2 y CDR3 se han reemplazado respectivamente por SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26.

30 Brevemente, una secuencia de inmunoglobulina humana se aísla de bases de datos por su alta similitud de secuencia con los dominios CDR y/o FR del anticuerpo murino, especialmente los dominios CDR y/o FR como se define por su SEQ ID en la presente solicitud. Al menos una, preferiblemente todas, CDR del dominio VL y/o el dominio VH de la secuencia de inmunoglobulina humana se reemplaza(n) por la CDR murina correspondiente, bien por ingeniería genética o por síntesis química de la secuencia de longitud completa. Opcionalmente, puede llevarse a cabo análisis *in silico* tridimensional para modificar (por sustitución, adición y/o delección) uno o más aminoácidos del marco humano por el o los aminoácidos correspondientes encontrados en la o las mismas posiciones en el marco murino (independientemente en el dominio VL y VH).

35 También están englobados, en la invención, fragmentos funcionales de este anticuerpo monoclonal de cuatro cadenas, quimérico y humanizado, siempre que estos fragmentos todavía se unan al epítipo de ferritina, como se ha definido anteriormente. Estos fragmentos incluyen fragmento Fv (asociación no covalente de los dominios VH y VL de la invención) y fragmento Fab, como se ha definido anteriormente.

40 La invención también está dirigida a moléculas basadas en fragmento Fab como se ha definido anteriormente, tal como anticuerpos biespecíficos o triespecíficos (véase la definición anteriormente), o anticuerpos bifuncionales o trifuncionales. En una realización particular, un Fab como se ha definido anteriormente se une a un ligando tal como una citoquina, un receptor o cualquier proteína de interés, para formar un anticuerpo bifuncional.

45 La invención también se refiere a moléculas semejantes a anticuerpo como se ha definido anteriormente y que comprenden al menos un dominio ligero variable (VL) de la invención, murino o híbrido humano/murino, y particularmente el dominio ligero variable como se define en SEQ ID NO: 2 o una variante de ésta en combinación con al menos un dominio pesado variable (VH) de la invención, murino o híbrido humano/murino, y particularmente el dominio pesado variable como se define en SEQ ID NO: 4.

50 En una realización particular, la parte C-terminal del dominio ligero variable (VL) de la invención está unida (directamente o mediante un conector) a la parte N-terminal del dominio pesado variable (VH) de la invención, para formar un scFv. En otra realización de scFv, la parte C-terminal del dominio pesado variable (VH) de la invención está unida (directamente o mediante un conector) a la parte N-terminal del dominio ligero variable (VL) de la invención. Estos scFv pueden usarse para formar Bis-scFv o fragmento divalente, con otros scFv que reconocen el mismo epítipo y/o antígeno o uno diferente. Todas las demás moléculas basadas en estos scFv también se

consideran por el experto en la técnica, siempre que dicha molécula semejante a anticuerpo retenga la actividad de unión a ferritina.

En otro aspecto, la presente solicitud está dirigida a un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico que comprende:

- 5 - dos cadenas pesadas que comprenden una secuencia de dominio VH codificada por un polinucleótido que comprende desde 5' a 3' SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 25, y
- dos cadenas ligeras que comprenden una secuencia de dominio VL codificada por un polinucleótido que comprende desde 5' a 3', SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

10 En otro aspecto, el polinucleótido del dominio VL consiste esencialmente en (SEQ ID NO: 1 y/o el polinucleótido del dominio VH consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3.

Un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico particular, por ejemplo, comprende:

- 15 - dos cadenas pesadas codificadas por un polinucleótido que comprende desde 5' a 3' SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 25 unido a un polinucleótido que codifica una región constante CH1 tal como SEQ ID NO: 5 unido a un polinucleótido que codifica una región Fc humana como la seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9, y
- dos cadenas ligeras codificadas por un polinucleótido que comprende desde 5' a 3' SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23 unido a un polinucleótido que codifica una región lambda o kappa tal como SEQ ID NO: 11.

20 En otro aspecto más, la cadena pesada está codificada por un polinucleótido que comprende desde 5' a 3', SEQ ID NO: 3 unido a SEQ ID NO: 5 unido a un polinucleótido que codifica una región Fc humana tal como la seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la cadena ligera está codificada por un polinucleótido que comprende desde 5' a 3' SEQ ID NO: 1 unido a SEQ ID NO: 11.

25 En otro aspecto más, el anticuerpo anti-ferritina monoclonal, quimérico o humanizado, o fragmentos de éste así como las moléculas semejantes a anticuerpo de la presente invención están acoplados a un agente bioactivo tal como un fármaco, isótopos radiactivos, toxinas, o células inmunes asesinas tales como células asesinas naturales o células T asesinas auxiliares. Este acoplamiento puede ser a través de conectores tales como aminoácidos, conectores β -glucurónido tales como los descritos en Jeffrey et al "Development and Properties of β -Glucuronide linkers for Monoclonal Antibody-Drug conjugates, Bioconjugate Chem. 17 (3) 831-840 (2006) y Patente U.S. 7.098.308.

30 Los fármacos que pueden bien administrarse con el anticuerpo monoclonal o la molécula semejante a anticuerpo de la presente invención o conjugarse con este anticuerpo monoclonal o las moléculas semejantes a anticuerpo incluyen agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, clorambucilo, clorometano, ciclofosfamida isofamida, melfalén y semejantes; fuentes de nitrógeno tales como carmustina, fotemustina, lomustina y semejantes; fármacos de platino tales como cisplatino, oxaliplatino, BBR3464, Busulfán, Tiotepa y semejantes; antimetabolitos tales como fármacos de ácido fólico de aminopterina, metotrexato y semejantes; fármacos de purina tales como cladribina, clofarabina y semejantes; y fármacos de pirimidina tales como fluorouracilo, capecitabina, citarabina, floxuridina, gemcitabina y semejantes. Las mezclas de estos fármacos también pueden usarse con el anticuerpo monoclonal o la molécula semejante a anticuerpo de la presente descripción, dependiendo del tipo de cáncer que se va a tratar. Por ejemplo, gemcitabina y paclitaxel pueden administrarse a pacientes que tienen cáncer de mama con el anticuerpo monoclonal o la molécula semejante a anticuerpo de la presente descripción.

40 Los isótopos radiactivos que pueden conjugarse con los anticuerpos monoclonales o moléculas semejantes a anticuerpo incluyen emisores gamma, beta, alfa, alfa-beta y beta-gamma como se define en la Tabla siguiente:

Radioisótopo	Radiación emitida	Nota
²¹¹ At	Alfa	
²¹³ Bi	Alfa-Beta-Gamma	Uso para radiación alfa
⁵¹ C	Gamma	
⁶⁴ Cu	Beta-Gamma	
¹⁶⁵ Dy	Beta	
¹⁶⁹ Er	Beta	
¹⁸ F	Beta-Gamma	
⁶⁸ Ga	Beta-Gamma	
⁶⁷ Ga	Beta-Gamma	Uso para radiación gamma
¹⁶⁶ Ho	Beta-Gamma	Uso para ambos tipos de radiaciones
¹¹¹ In	Gamma	
¹²³ I	Gamma	
¹²⁵ I	Beta-Gamma	Uso para ambos tipos de radiaciones
¹³¹ I	Beta-Gamma	Uso para ambos tipos de radiaciones
¹⁹² Ir	Beta-Gamma	
⁵⁹ Fe	Beta-Gamma	
¹⁷⁷ Lu	Beta-Gamma	
³² P	Beta	
⁴² K	Beta-Gamma	
¹⁸⁶ Re	Beta-Gamma	
¹⁸⁸ Re	Beta-Gamma	Uso para radiación beta
¹⁵³ Sm	Beta-Gamma	Uso para radiación beta
⁷⁵ Se	Gamma	
²⁴ Na	Beta-Gamma	
⁸⁹ Sr	Beta	
^{99m} Tc	Gamma	
²⁰¹ Tl	Beta-Gamma	
¹³³ Xe	Beta	
⁹⁰ Y	Beta	

5 Estos isótopos pueden unirse al anticuerpo anti-ferritina monoclonal, quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como las moléculas semejantes a anticuerpo de la descripción a través de agentes quelantes tales como ligandos bifuncionales, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y cualquiera de sus derivados, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) y cualquiera de sus derivados, o cualquier ligando macrocíclico, ácido 1,3 bis[N-[N-(2-aminoetil)-2-aminoetil]-2-aminoacetamido]-propano-N,N,N',N'',N''',N''''',N''''''-octaacético (LiLo), éster etílico de N-(S-acetilmercaptoacetil)(p-NCS) fenilalanilglicilglicina (para marcaje ^{99m}Tc ó ¹⁸⁶Re), 5,7-dioxo-1,11-carboximetil)-1,4,8,11-tetraazaciclotridecano, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotridecano-N,N',N'',N'''-

tetraacético (TRITA) ácido 1,4,8,11-tetraaxacilotetra-decano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), ácido 1,5,9,13-tetraazaciclohexa decano-N,N',N''',N''''-tetraacético (HETA).

5 Los ejemplos de toxinas incluyen toxinas Coley, cadena A de ricina, PAP (toxina antiviral de fitolaca), bacterias *Staphylococcus aureus* (SEB), exotoxina de *Pseudomonas*, y semejantes. Las toxinas pueden acoplarse al anticuerpo monoclonal de la presente descripción o pueden administrarse simultáneamente con éste.

10 Además de los fármacos y radioisótopos, también pueden acoplarse otras moléculas biológicas al anticuerpo anti-ferritina monoclonal, quimérico o humanizado o fragmentos de éste así como las moléculas semejantes a anticuerpo de la presente descripción tales como moléculas de enzimas, ácidos nucleicos, ARN anti-sentido, ARNs, biotina, estreptavidina o avidina para mejorar la especificidad de unión del anticuerpo, o moléculas biológicas que pueden unirse a un tipo de célula específico y semejantes.

Es destacable que al menos dos anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados, fragmentos o moléculas semejantes a anticuerpo de la descripción pueden combinarse en cualquier combinación en una única composición.

15 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende (a) un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal humanizado, un fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico, un anticuerpo bifuncional, una molécula scFv, un Bis-scFv o un fragmento divalente de la invención, tal como un anticuerpo monoclonal que comprende como una cadena ligera SEQ ID Nos: 2 y 12, y como una cadena pesada SEQ ID Nos. 4, 6 y 8 o SEQ ID Nos. 4, 6 y 10, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen transportadores, excipientes y estabilizadores. Las formulaciones pueden prepararse como se muestra en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol A. editor (1980). Los ejemplos de transportadores, excipientes y estabilizadores incluyen disolución salina, PBS, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina de suero, inmunoglobulinas, gelatinas; polímeros hidrofílicos tales como PVP; aminoácidos de glicina, glutamina, arginina, lisina o asparaginas; carbohidratos tales como glucosa, manosa o dextrinas; alcoholes azúcar incluyendo manitol o sorbitol; contraiones que forman sal tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos tal como Tween®.

30 La composición farmacéutica puede administrarse por infusión, intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, intraarterialmente o por sistemas de liberación sostenida tal como liposomas o ácido poliláctico-coglicólico. Los sistemas de liberación sostenida se describen en la Patente U.S. 5.255.212 y Lewis "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer." En M. Chasin y R. Langer (Eds.) Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Decker: Nueva York, 1990).

35 Las dosificaciones y concentraciones de fármaco pueden determinarse dependiendo del uso particular pretendido, el estadio y tipo de cáncer que se va a tratar, así como el peso corporal del mamífero. Pueden usarse procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la toxicidad y eficacia terapéutica usando cultivos celulares o animales experimentales. Habitualmente, pueden determinarse la DL₅₀ (dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). El índice terapéutico es la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos.

Los datos obtenidos de los ensayos anteriores pueden usarse en un intervalo de dosificación para uso humano y mamífero. Generalmente, se administran dosis de 1 ng/kg a 100 mg/kg.

40 La presente solicitud también describe un método para administrar un fármaco, materiales radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos a células que contienen ferritina básica y ácida, comprendiendo dicho método administrar a un mamífero que necesita dicho tratamiento una composición que comprende (a) un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal humanizado, un fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico, un anticuerpo bifuncional, una molécula scFv, un Bis-scFv o un fragmento divalente como se describe en la presente memoria, en particular un anticuerpo que comprende como una cadena ligera SEQ ID Nos: 2 y 12, y como una cadena pesada SEQ ID Nos. 4, 6 y 8 o SEQ ID Nos. 4, 6 y 10, y (b) una composición seleccionada del grupo de fármacos, isótopos radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos, en el que dicha composición está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 La construcción quimérica que tiene SEQ ID NO: 8 tiene función efectora ADCC, para aumentar el rendimiento de este anticuerpo monoclonal, también puede usarse en la formulación un isótopo radiactivo o un fármaco antimetabolito tal como gemcitabina.

55 Como se ha discutido anteriormente, el fármaco, isótopos radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos pueden unirse al anticuerpo monoclonal, el fragmento o la molécula semejante a anticuerpo como se describe en la presente memoria, bien a través de un agente quelante o un conector o pueden administrarse simultáneamente o a intervalos específicos con el anticuerpo monoclonal, el fragmento o la molécula semejante a anticuerpo de la presente descripción.

- En otro aspecto más, la presente solicitud describe un método para tratar un cáncer seleccionado del grupo de cáncer pancreático, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi y carcinoma hepatocelular, comprendiendo dicho método administrar a un mamífero que necesita dicho tratamiento (a) un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal humanizado, un fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico, un anticuerpo bifuncional, una molécula scFv, un Bis-scFv o un fragmento divalente como se describe en la presente memoria, en particular un anticuerpo que comprende como una cadena ligera SEQ ID Nos: 2 y 12, y como una cadena pesada SEQ ID Nos. 4, 6 y 8 o SEQ ID Nos. 4, 6 y 10, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente una composición seleccionada del grupo de fármacos, isótopos radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas y combinaciones de éstos.
- En otro aspecto, la presente solicitud se refiere a ácidos nucleicos (o polinucleótidos) que codifican cualquier dominio ligero variable (VL), cualquier dominio pesado variable (VH), cualquier cadena ligera, cualquier cadena pesada o cualquier polipéptido como se describe en la presente solicitud.
- En otro aspecto, un ácido nucleico que codifica un dominio ligero variable comprende, desde 5' a 3', SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23. En otro aspecto más, estas SEQ ID no son contiguas. En otro aspecto, el ácido nucleico consiste esencialmente en o comprende SEQ ID NO: 1 o cualquier variante de polinucleótido de ésta.
- En otro aspecto, un ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable comprende, desde 5' a 3', SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 25. En otro aspecto más, estas SEQ ID no son contiguas. En otro aspecto, el ácido nucleico consiste esencialmente en o comprende SEQ ID NO: 3 o cualquier variante de polinucleótido de ésta.
- En otro aspecto, un polinucleótido que codifica un dominio ligero variable de la invención (tal como SEQ ID NO: 1) también comprende una secuencia de cadena kappa o lambda, tal como SEQ ID NO: 11. Así, la parte 3' del polinucleótido de dominio ligero variable está unida genéticamente a la parte 5' de SEQ ID NO: 11, posiblemente mediante una secuencia conectora. En otro aspecto, el polinucleótido de dominio ligero variable está unido en su parte 5' a un péptido señal tal como el que tiene SEQ ID NO: 13.
- En otro aspecto más de la presente descripción, un polinucleótido que codifica un dominio pesado variable de la presente solicitud (tal como SEQ ID NO: 3) también comprende una secuencia de región constante CH1 humana, tal como SEQ ID NO: 5. Así, la parte 3' del polinucleótido de dominio pesado variable está unida genéticamente a la parte 5' de SEQ ID NO: 5, posiblemente mediante una secuencia conectora. En otro aspecto más, un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica un dominio pesado variable de la presente solicitud (tal como SEQ ID NO: 3) y SEQ ID NO: 5 también comprende una secuencia que codifica una región Fc humana, tal como SEQ ID Nos 7, 9 o una región Fc murina (SEQ ID NO: 17). En ese caso, la SEQ ID NO: 7, 9 ó 17 está unida genéticamente por su parte 5' a la parte 3' de SEQ ID NO: 5. Independientemente o en combinación con las realizaciones anteriores, un polinucleótido de dominio pesado variable está unido en su parte 5' a un péptido señal tal como el que tiene SEQ ID NO: 15.
- Los ácidos nucleicos particulares son:
- un polinucleótido que comprende desde 5' a 3' un polinucleótido de dominio ligero variable como se describe en la presente memoria (tal como SEQ ID NO: 1) y SEQ ID NO: 11,
 - una secuencia que comprende desde 5' a 3' SEQ ID NO: 13, un polinucleótido de dominio pesado variable como se describe en la presente memoria y SEQ ID NO: 11,
 - una secuencia que comprende desde 5' a 3' un polinucleótido de dominio pesado variable como se describe en la presente memoria (tal como SEQ ID NO: 3), SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que codifica una región Fc, tal como una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17, y
 - una secuencia que comprende desde 5' a 3' SEQ ID NO: 15, un polinucleótido de dominio pesado variable de la invención, SEQ ID NO: 5 y un polinucleótido que codifica una región Fc, tal como una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17.
- Otra secuencia es la que codifica el ScFv descrito anteriormente y que tiene un polinucleótido de dominio ligero variable de la invención (tal como SEQ ID NO: 1) unido genéticamente a un polinucleótido de dominio pesado variable descrito en la presente memoria (tal como SEQ ID NO: 3), siempre que scFv retenga la actividad de unión a ferritina.
- Los ácidos nucleicos aislados que tienen al menos 95% ó 98% ó 99% de identidad de secuencia con los polinucleótidos de dominio pesado y ligero variable descritos en la presente memoria, y con SEQ ID NOS. 1 y 3, también están englobados en un aspecto de la presente descripción. En los ácidos nucleicos o polinucleótidos definidos anteriormente, las varias SEQ ID pueden reemplazarse, individualmente e independientemente entre sí, por una variante que tiene al menos 85%, 90%, 95% ó 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45, con la condición de que dichos varios dominios codificados por estas secuencias de nucleótidos permitan que el anticuerpo monoclonal resultante o moléculas semejantes a anticuerpo mantengan la actividad de unión de AMB8LK a ferritina humana ácida y básica. Las

variantes de polinucleótido son variantes que contienen sustituciones conservativas, es decir, una sustitución de nucleótido que no modifica la naturaleza del aminoácido codificado. Otra sustitución de nucleótido particular son semi-conservativas, es decir, que el aminoácido codificado es de la misma clase que el aminoácido original, como se ha detallado anteriormente.

- 5 La solicitud se refiere además a ácidos nucleicos que codifican el polipéptido o que hibridan, opcionalmente sobre la secuencia de longitud completa, con una secuencia de ADN que consiste en la secuencia de nucleótido que codifica dicho polipéptido en condiciones astringentes. Estas condiciones astringentes se describen por Sambrook et al, Molecular Cloning Manual, 3ª edición (2001), es decir, como un ejemplo las condiciones siguientes: tampones de hibridación: 2 X SSC, 10 X disolución de Denhardtts (Ficoll 400 y PEG y BSA, proporción 1:1:1), 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Na₂HPO₄, 250 µg/ml ADN de esperma de arenque, 50 µg/ml de ARNt ó 0,25 M de tampón fosfato de sodio con un pH de 7,2, 1 mM EDTA, 7% SDS;

Temperatura de hibridación: 60⁰C;

Tampón de lavado: 2 X SSC, 0,1% SDS;

Temperatura de lavado: 60⁰C.

- 15 La solicitud se refiere además a vectores de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico como se define en la presente solicitud, y en vectores que comprenden un polinucleótido de dominio pesado variable descrito en la presente memoria y/o un polinucleótido de dominio ligero variable descrito en la presente memoria, y vectores que comprenden SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3.

- 20 Por ejemplo, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica cadenas ligera y pesada como se describe en la presente memoria comprende los dominios variables pesados y variables ligeros del anticuerpo monoclonal murino AMB8LK, una región pesada constante 1 de Fab' 2-3 cisteína humana, una región ligera constante kappa humana y una región constante Fc región de cadena pesada constante de IgG1 o IgG4 humana o un y2a murino.

- 25 Los vectores pueden ser vectores de clonación tales como plásmidos o virus modificados, pero también pueden ser bacteriófagos tales como derivados lambda, pBR322, derivados del plásmido pUC del vector Bluescript. En otra realización, los ácidos nucleicos se insertan en vectores plasmídicos de baculovirus tales como pVL941.

En otra realización más, el vector comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera descrita en la presente memoria. En otro aspecto, el vector comprende un ácido nucleico que codifica la cadena pesada descrita en la presente memoria. En otra realización, el vector comprende un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y cadena ligera descrita en la presente memoria.

- 30 Los métodos para producir anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpo de la presente descripción que comprenden crecer células que contienen los vectores recombinantes anteriores también es un aspecto de la presente solicitud. A este respecto, las células pueden ser células CHO, *E. coli*, células de levadura, células VERO, células HELA, células COS, células CR: 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, A549, PC12, K562, células 293, células de insecto tales como células Sf9 de *Spodotera frugiperda* (ATCC 358 CRL 1711), células Cv1 y semejantes. Según el ácido nucleico insertado en los vectores, y el número de vectores transducido en las células, la proteína o el anticuerpo o molécula semejante a anticuerpo se expresa en la célula y puede recuperarse por métodos conocidos en la técnica tal como mediante columnas.

- 35 Pueden usarse cualesquiera secuencias reguladoras de la expresión, tales como promotores, en los vectores de la presente descripción. Los ejemplos de dichos promotores incluyen promotores tempranos de SV40, el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de timidina del herpes, la secuencia reguladora del gen de metalotioneína, vectores de expresión procariontas tales como el promotor de beta-lactamasa o el promotor lac y semejantes, así como promotor de polihedrina (Ph) o promotor10 (ambos adaptados para expresión en baculovirus).

- 40 Los anticuerpos monoclonales quiméricos, fragmentos o moléculas semejantes a anticuerpo de la presente descripción pueden sintetizarse usando métodos químicos basados en las secuencias descritas en la presente memoria. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hunkapiller et al., Nature 310: 105-111.

- 45 Los anticuerpos monoclonales quiméricos, fragmentos o moléculas semejantes a anticuerpo de la presente descripción pueden obtenerse por técnicas recombinantes. Por lo tanto, la solicitud también se refiere a anticuerpos monoclonales, fragmentos o moléculas semejantes a anticuerpo como se ha definido anteriormente, obtenidos por expresión de al menos un ácido nucleico de la invención. En este caso, la construcción de vectores adecuados que contienen las secuencias codificadoras y de control deseadas emplean técnicas de ligación estándar. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden a medida y se religan en la forma deseada para formar el plásmido requerido.

La escisión de las secuencias se completa usando endonucleasas (enzimas de restricción) apropiadas en un tampón adecuado. Estas técnicas de escisión son muy conocidas para los expertos en la técnica. Si se requieren extremos romos, la preparación se trata a 15^oC durante 15 minutos con 10 unidades de ADN Polimerasa de *E. coli* (fragmento Klenow), se extrae con fenol-cloroformo y se precipita con etanol.

5 La separación por tamaño de los fragmentos puede llevarse a cabo como se describe por Goeddel, D. et al *Nucleic Acid Res.* 8: 4057 (1980). Para la ligación, se tratan aproximadamente cantidades equimolares de los componentes deseados con extremos a medida adecuados para proporcionar concordancia correcta, con 10 unidades de ADN ligasa T4 por 0,5 µg de ADN.

10 Los vectores de expresión construidos se usan para transformar células adecuadas. Las cadenas ligera y pesada se transforman en una misma célula, bien dos vectores cada uno portando la cadena ligera o la pesada o un único vector que contiene ambos genes y capaz de expresar las cadenas tanto ligera como pesada.

15 Las células se crecen en condiciones para la producción de la proteína deseada. La proteína se recupera del cultivo celular por métodos conocidos en la técnica. El proceso de recuperación depende del tipo de células usadas para la producción de la proteína. Cuando las cadenas ligera y pesada se coexpresan, el procedimiento de aislamiento se planea para recuperar el anticuerpo constituido. Cuando están presentes péptidos señal en la parte N-terminal de los dominios variables pesado y ligero, se esciden en las células antes del ensamblaje de los dominios variables ligero y pesado y si es apropiado, las cadenas que los comprenden.

20 Para construir los anticuerpos monoclonales, fragmentos o moléculas semejantes a anticuerpo, las partes deseadas de los genes que codifican las cadenas ligera y pesada (o dominios ligeros y pesados variables) de fuentes adecuadas se religan usando ligasas. Así, las fuentes del gen de cadena pesada y el gen de cadena ligera (o VH y VL) que codifican las partes variables producidos por el hibridoma murino AMB8LK se recuperan y se clonan. A partir de este cultivo y fragmentos génicos que codifican las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de gamma 1 humano, gamma 4 humano, kappa humano y Fab'2 se recuperan y se clonan de células de mieloma humano. Se usan enzimas de restricción adecuadas para ligar las partes variables a las partes ligeras del gen de ratón a las partes constantes del gen humano para cada una de las dos cadenas.

25 Una vez los anticuerpos monoclonales, fragmentos o moléculas semejantes a anticuerpo de la presente descripción se fabrican como se ha descrito anteriormente con o sin fármacos, radioisótopos, toxinas, células asesinas naturales y combinaciones de éstos, pueden ensayarse para inmunoreactividad con ferritina humana usando ensayos ELISA o RIA como se muestra en los Ejemplos. Esto es especialmente útil cuando se usan variantes de las secuencias y/o fragmentos.

30 Se han descrito varias realizaciones de la invención, como se muestra a continuación.

Ejemplo 1 - Anticuerpo anti-ferritina monoclonal AMB8LK

35 AMB8LK es un anticuerpo anti-ferritina IgG1 monoclonal a 1-10 mg/ml en PBS. Este anticuerpo se obtuvo como se ha descrito previamente por Kadouche et al [Analysis of various isoforms of ferritin with monoclonal antibodies]. *C R Seances Acad Sci III* 1982: 295 (6) 443-8, después de inmunizar ratones Balb/c hembras con ferritina extraída de bazo humano. Las células del bazo de los mejores respondedores se fusionaron con células de mieloma Sp2/0 murino (Número ATCC: CRL-1581) usando polietilén glicol 4000 según protocolos estándar y se clonaron hibridomas seleccionados, se expandieron y se cultivaron *in vitro*. AMB8LK se seleccionó por su muy alta afinidad de 5,1 X 10⁻⁹ M, y su especificidad para ferritina humana.

40 Ejemplo 2 - Conjugación de los quelatos DPTA y DOT A en AMB8LK

45 Los quelantes bifuncionales *p*SCN-Bz-DTPA (ácido 2-(4-isotiocianatobencil)-dietilentriaminopentaacético), *p*SCN-Bz-CHX-A"-DTPA (ácido (*R*)-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(*S,S*)-ciclohexano-1,2-diamina-pentaacético) y *p*SCN-Bz-DOTA (ácido 2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) (Fig. 10) se adquirieron en Macrocylics. Estos ligandos se conjugaron con AMB8LK como se ha descrito previamente por Cooper et al., "Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metallic isotopes." *Nature Protocols* 2006; 1:314-17. Brevemente, el anticuerpo se preincubó a temperatura ambiente con EDTA, se transfirió a HEPES 0,1 M, pH 8,5 y la concentración se ajustó a 5-10 mg/ml. Se añadieron gota a gota disoluciones de los quelantes en etanol a la disolución de anticuerpo a 50 equivalentes de quelato/anticuerpo, a no ser que se indique otra cosa. Se dejó que la reacción procediera toda la noche a 37^oC. El tampón se cambió en tampón acetato de amonio 0,1 M, pH 6 y la eliminación del quelante no unido se realizó usando ultrafiltración con un punto de corte de peso molecular de 30 kDa. La concentración final del anticuerpo se determinó por absorbancia UV a 280 nm. Para facilitar la descripción, Bz-DTPA-AMB8LK se describe a continuación como DTPA-AMB8LK; el Bz-CHX-A-DTPA-AMB8LK como CHX-DPTA"-AMB8LK y el Bz-DOTA-AMB8LK se designa DOTA-AMB8LK.

55 El número de quelatos conjugados con el anticuerpo se determinó usando un ensayo con ⁵⁷Co como se describe (Meares et al., "Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions." *Anal Biochem* 1984; 142 (1):68-78). Se incubó una cantidad constante de ⁵⁷CoCl₂ de actividad específica conocida (ICN, Basingstoke, Hamps, Londres) con

cantidades crecientes de anticuerpo conjugado durante 1-2 horas a temperatura ambiente ó 37°C para el conjugado DOTA. La reacción se paró añadiendo 50 mM EDTA en 0,1 acetato de amonio, 2-10% vol/vol. Las disoluciones se analizaron por cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) (Pall Life Sciences, Portsmouth, Reino Unido) usando la disolución de EDTA como la fase móvil. El Co no unido migró con el frente de disolvente, mientras el anticuerpo marcado con ⁵⁷Co permaneció en el origen de la tira. La actividad en cada parte de la tira se midió con un contador gamma 1282 (LKB, Wallac). La regresión lineal de los resultados usando la ecuación % de actividad unida - f(cantidad de Ab) permitió la determinación del número medio de quelatos conjugados a cada molécula de anticuerpo.

Las condiciones óptimas para la conjugación del quelante se determinaron después de incubar cantidades iguales de AMB8LK con cantidades crecientes de pSCN-Bz-DTPA a 4°C, RT ó 37°C durante varios tiempos. Para conseguir una conjugación de aproximadamente 3 sustituciones de quelatos por anticuerpo, se usó una proporción de reacción de quelato por anticuerpo de 50:1, se incubó toda la noche a 37°C. La incubación de toda la noche a temperatura ambiente produjo un rendimiento de aproximadamente 1,7 DTPA/anticuerpo (Ab) y la incubación a 37°C durante 6 horas, aproximadamente 1,5 DTPA/Ab. La eficiencia de la conjugación fue similar para los tres quelantes: se consiguió la conjugación efectiva de 3 Bz-DTPA por Ab, 3 Bz-CHX-A'-DTPA por Ab y 3,2 Bz-DOTA por Ab. Se formó menos de 4% de agregados de anticuerpo durante el proceso de conjugación según se determina por SE-HPLC.

Ejemplo 3 - Cromatografía de exclusión por tamaño

Se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta resolución para exclusión por tamaño (SE-HPLC) usando un módulo de disolvente-bomba Beckman 114M con un módulo de inyección Beckman 340 y un detector de absorbancia Beckman 160 conectado a un detector de radiactividad gamma Raytest. La fase estacionaria fue una columna BioSep SEC-S3000 300x7,8 mm (Phenomex, Cheshire, Reino Unido). Se usó elución isocrática con 0,1 M tampón fosfato (0,06 M Na₂HPO₄, 0,04 M NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, pH 7) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Los cromatogramas se analizaron usando software Galaxie (Novell).

Ejemplo 4 - Radiomarcaje con indio e itrio

El cloruro de indio [¹¹¹In] (emisor gamma), ¹¹¹MBq en 500 µl de 0,05 HCl se adquirió en Mallinckrodt (Petten, Holanda). El cloruro de itrio [⁹⁰Y] (emisor beta puro) 185 MBq, se adquirió en MDS Nordion (Fleurs, Bélgica) y se disolvió en HCl 0,05 M para proporcionar un volumen final de 100 µl.

El pH del indio o itrio se ajustó a 6 añadiendo 0,1 M acetato de amonio, pH 6 (20% del volumen final). Los anticuerpos conjugados se añadieron para obtener una actividad específica de 130 MBq/mg de anticuerpo (a no ser que se indique otra cosa) y se incubaron durante 30-60 minutos a temperatura ambiente para los conjugados de DTPA o a 37°C para el DOTA. Las reacciones de marcaje se realizaron típicamente usando 50 µg de anticuerpo con 6,5 MBq de radionúclido. La reacción se paró añadiendo 2-10% vol/vol de EDTA 50 mM y se añadió PBS para producir una concentración de aproximadamente 10 MBq/ml. La eficiencia del marcaje se determinó por TLC usando 50 mM EDTA en 0,1 acetato de amonio, pH 6 como la fase móvil. En estas condiciones, los anticuerpos radiomarcados tienen un Rf= 0 mientras el radionúclido no unido tiene un Rf= 1. El porcentaje de actividad se midió después de cortar la tira en dos y contando la actividad en cada parte en un contador gamma 1282 (LKB, Wallac, Finlandia). La eficiencia del marcaje se expresó como (cpm origen)/cpm origen + cpm frente) X 100. La eficiencia del marcaje también se determinó por HPLC usando una fase móvil isocrática con tampón fosfato e integrando los picos con el software Galaxie (Novell).

El incremento del tiempo de incubación a 1 hora no mejoró significativamente la eficiencia del marcaje mientras el incremento de la temperatura a 37°C para los conjugados DTPA mejoró la eficiencia de marcaje sólo un 1% comparado con el marcaje a temperatura ambiente. Después de haber ensayado los parámetros de tiempo y temperatura, se ensayaron actividades específicas que variaron de 40-330 MBq/mg de Ab. No se observó una diferencia significativa en los resultados del marcaje. También se estudió el efecto de la concentración radiactiva durante la reacción de marcaje. Los resultados del marcaje con indio usando concentraciones de radiactividad que variaron de 100 a 330 MBq/ml demostraron que en este intervalo de concentración, las eficiencias del marcaje fueron similares.

Ejemplo 5 - Estabilidad *in vitro* de los inmunoconjugados radiomarcados

La estabilidad de los inmunoconjugados marcados con ¹¹¹In y ⁹⁰Y se evaluó en PBS y en plasma, a 4°C y 37°C, respectivamente. El radiomarcaje se realizó como se ha descrito anteriormente, se añadieron 4-6 MBq del anticuerpo monoclonal radiomarcado a PBS o plasma para producir un volumen final de 0,4-0,5 ml. Se analizaron 10 µl (0,05 MBq) del anticuerpo radiomarcado por SE-HPLC y se recogieron 0,5 ml de fracciones de eluato durante 30 minutos. La actividad en cada fracción se contó usando un contador gamma y el perfil de elución se representó a partir de estos resultados. Se determinó el porcentaje de anticuerpo radiomarcado que permanece con el tiempo. Para el estudio de estabilidad en PBS, además de SE-HPLC, se realizó ITLC usando 50 mM EDTA como la fase móvil.

Los dos inmunoconjugados ¹¹¹In-DTPA almacenados a 4°C en PBS mostraron más de 98% de estabilidad durante 7 días, mientras el conjugado ¹¹¹In-DOTA mostró 94%. La estabilidad de los anticuerpos marcados con ⁹⁰Y

almacenados en las mismas condiciones fue aproximadamente 80%. En plasma a 37°C, los compuestos de indio e itrio fueron estables durante al menos 7 días (pérdida de menos de 3% de actividad).

Ejemplo 6 - Inmunoreactividad de estos inmunoconjugados en ferritina pura: ELISA y RIA

5 La inmunoreactividad de los tres inmunoconjugados se evaluó usando un ELISA. Los ensayos preliminares usando ferritina (ferritina de hígado humano, Calbiochem) adsorbida toda la noche a 0,1, 1,5 y 10 µg/ml mostraron que la concentración óptima de ferritina para el ensayo era 5 µg/ml de ferritina. Así, se adsorbieron 5 µg/ml de ferritina en PBS en una placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc). Los pocillos se lavaron con PBS-0,4% Tween-20 y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con PBS-0,5% BSA. Los anticuerpos conjugados y el anticuerpo no conjugado usado como un control se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS-0,5% BSA, a 10 concentraciones que variaron de 10^{-8} a 10^{-1} mg/ml (50 µl por pocillo). Los pocillos se lavaron con PBS-0,4% Tween-20 y se añadió el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina, Sigma) a una dilución 1:25.000 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavados, se añadieron pastillas de sustrato fosfato de p-nitrofenilo, pNPP, Sigma) (1 mg/ml pNPP en 0,2 M tampón Tris, 5 mM cloruro de magnesio). La reacción se paró después de 30 minutos con 3 M NaOH, 1/1 vol/vol. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de placas DTX 880 (Beckman Coulter) y los resultados se analizaron usando el software GraphPad Prism (San Diego, California). Los resultados mostraron una disminución ligera en la unión de ferritina de los conjugados comparado con la del anticuerpo nativo (Fig. 11). Sin embargo, no se pudo observar ninguna diferencia entre los tres compuestos.

20 Se realizó un radioinmunoensayo en fase sólida usando anticuerpos marcados con ^{111}In y ^{90}Y . Se incubaron tubos Maxisorp (Nunc) toda la noche a 4°C con 1,5 a 10 µg/ml de ferritina en PBS. Después de lavar, se bloquearon con PBS-0,5% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron $6,25 \times 10^3$, $12,5 \times 10^3$ y 25×10^3 CPM (200 µl) de los anticuerpos en los tubos recubiertos. La actividad en cada tubo se contó en el contador gamma, los tubos se lavaron tres veces con PBS-0,4% Tween-20 y se contó la actividad remanente. La diferencia entre actividades con y sin las disoluciones de anticuerpo radiomarcado indicó el porcentaje de anticuerpo unido. Para la evaluación de la unión no específica a ferritina, se añadió un exceso de 100 veces de anticuerpo no conjugado a la disolución más concentrada de anticuerpo radiomarcado. La unión no específica del anticuerpo se evaluó en tubos no recubiertos. Los resultados mostraron que independientemente del radionúclido (indio o itrio), el compuesto DTPA-AMB8LK tenía la mayor reactividad con ferritina de los tres inmunoconjugados mientras el conjugado DOTA tenía la menor (Tabla 1 a continuación). Estos porcentajes de unión se calcularon teniendo en cuenta pequeñas diferencias en las eficiencias de marcaje de los tres compuestos en el día del experimento.

Ejemplo 7 - Inmunoreactividad de los inmunoconjugados radiomarcados en células CAPAN-1

La inmunoreactividad de los inmunoconjugados se evaluó en células que expresan ferritina usando el método descrito por Lindmo et al Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J Immunol Methods 1984; 72 (1):77-89.

35 Las células CAPAN-1 son un modelo relevante para cáncer pancreático humano (Kyriazis et al Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse:morphologic, biologic, and biochemical characteristics. Am J Pathol 1982; 106(2):250-60). Esta línea celular se estableció a partir de una metástasis de hígado de un adenocarcinoma ductal pancreático humano, es tumorigénica y metastásica en ratones desnudos y sobre-expresa ferritina. Se había mostrado que el fragmento F(ab)₂ de AMB8LK se une a CAPAN-1 (Goldstein et al., 40 The design and evaluation of a novel targeted drug delivery system using cationic emulsion-antibody conjugates. J Control Release 2005; 108 (2-3):418-32).

Las células CAPAN-1 se crecieron en RPMI, 10% suero fetal de ternera y 2 mM L-glutamina. Las células se recogieron a 70-85% de confluencia usando tripsina, se lavaron y se resuspendieron en PBS-0,5% BSA. Se fijaron y se permeabilizaron usando el kit Intrastain (Dako), según las instrucciones del fabricante. Las células se diluyeron en PBS-0,5% BSA a concentraciones que variaron de $1,25 \times 10^5$ hasta 12×10^6 células/ml y se incubaron 500 µl de estas suspensiones con una cantidad fijada de Ab marcado con ^{111}In (250 µl, 50 ng/ml, aproximadamente 100.000 CPM) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las suspensiones se centrifugaron a 5.000 X rpm durante 5 minutos, las células se lavaron con PBS-BSA y se contó la actividad en los sedimentos. La unión no específica se determinó por co-incubación del anticuerpo radiomarcado con un exceso de 1.000 veces de anticuerpo frío. Las cuentas radiactivas totales añadidas a cada tubo se dividieron por las cuentas unidas a células después de restar las cuentas unidas no específicamente. Estos valores se representaron frente al recíproco de la dilución de las células. Después de análisis por regresión lineal, se obtuvo la fracción inmunoreactiva a partir del recíproco del intercepto en el eje de las x.

55 Los ensayos, usando células CAPAN-1 no fijadas no permeabilizadas, no mostraron unión de los conjugados. Sin embargo, si las células se fijaban y permeabilizaban antes de la incubación con el anticuerpo, se consiguieron altos niveles de unión específica. Los experimentos demostraron que, como la ferritina pura, la reactividad del conjugado DTPA fue mayor que la del CHX-DTPA mientras el DOTA-AMB8LK tenía la reactividad menor en las células CAPAN-1 (Tabla 1 a continuación).

Tabla 1: Inmunoreactividad de AMB8LK conjugado en ferritina

	Ferritina pura ^a		Células ^b
	¹¹¹ In	⁹⁰ Y	¹¹¹ In
Bz-DTPA-AMB8LK	87,0%	100%	52%
Bz-CHX-A"-DTPA AMB8LK	74,8%	98,9%	43%
Bz-DOTA-AMB8LK	76,8%	73,2%	24%

^a Se inmovilizó la ferritina a 5 µg/ml en tubos, se incubaron los anticuerpos conjugados con indio o itrio a tres diluciones (3,75 a 15 X 10⁶ CPM). Los resultados se expresan como la media del porcentaje de anticuerpo unido después de lavar los tubos. La unión no específica de los anticuerpos fue menor de 2%.

^b Se incubaron cinco diluciones seriadas de células CAPAN-1 fijadas y permeabilizadas con los tres compuestos radiomarcados. Después de lavar, se contó la actividad unida a las células en un contador gamma. Los resultados se analizaron usando el software GraphPad; los análisis por regresión lineal de (CPM Totales/CPM Unidas) = f(dilución de células) fueron muy exactos con r² > 0,99 para los tres conjugados

Ejemplo 8 - Biodistribución de los anticuerpos conjugados radiomarcados con indio e itrio en ratones normales y que portan tumor

- 5 Todos los estudios con animales se realizaron de conformidad con el Acta de Animales de Reino Unido (Procedimientos Científicos) de 1986 y el Código de Práctica para la Estabulación y Cuidado de Animales usados en Procedimientos Científicos (Home Office, Reino Unido).

A. Biodistribución en ratones que no portan tumor

- 10 Se inyectó a 12 ratones Balb/c hembra 0,2 MBq de DTPA-AMB8LK, CHX-DTPA-AMB8LK o DOTA-AMB8LK marcados con ¹¹¹In (1,5 µg) en 50 µl de PBS. Se sacrificaron grupos de 4 animales por dislocación cervical después de 24 horas, 48 horas y 72 horas. Una muestra de su sangre, fémur y músculo se diseccionó y se pesó. También se recogieron el hígado, pulmón, estómago, bazo, intestino y riñones. La actividad en cada muestra se contó en un contador gamma junto con diluciones del ¹¹¹In-Ab inyectado. La captación se expresó como un porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido para la sangre, hueso y músculo, mientras para todos los demás órganos, la actividad se expresó como un porcentaje de la dosis inyectada por órgano.

- 20 Como puede observarse en la Tabla 2, el hígado mostró la mayor captación de todos los órganos, con una captación del CHX-DTPA- y el DOTA-AMB8LK de 13-15% de la dosis inyectada (DI), mientras que la del DTPA-AMB8LK fue 7-8%. Otros órganos que mostraron niveles significativos de captación fueron los huesos, especialmente por el conjugado CHX-DTPA (4,5 ± 1,5% de la DI después de 24 horas; 6,4 ± 2,0% después de 72 horas) y el intestino (<4% de la DI para los tres conjugados) (Tabla 2). La captación en el músculo, pulmón y riñones fue menor de 2%; la del estómago y bazo menor de 1%. La actividad circulante en la sangre fue la menor para DOTA-AMB8LK (5,7 ± 3,9% de la DI/g después de 24 horas y 3,1 ± 2,1% después de 72 horas); las actividades de los dos conjugados DTPA en la sangre fueron similares después de 24h pero el aclaramiento posterior del CHX-DTPA-AMB8LK fue más rápido que el de DTPA-AMB8LK (Tabla 2 a continuación). Tomando como base estos resultados, el DTPA-AMB8LK pareció ser el más prometedor de los tres inmunoconjugados a pesar de su aclaramiento de la sangre relativamente lento (aún así 12, 6 ± 0,8% de la DI/g 72 horas después de la inyección).

Tabla 2: Biodistribución de Bz-DTPA-, Bz-CHX-A'-DTPA y Bz-DOTA-AMB8LK marcados con ¹¹¹In en ratones normales

	<i>Bz-DTPA-AMB8LK</i> <i>Media ± SD, n=4</i>			<i>Bz-CHX-A'-DTPA-AMB8LK</i> <i>Media ± SD, n=4</i>			<i>Bz-DOTA-AMB8LK</i> <i>Media ± SD, n=4</i>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>Sangre</i>	15,8 ± 1,2	13,3 ± 1,8	12,6 ± 0,8	16,7 ± 1,6	12,3 ± 1,2	9,7 ± 1,9	5,7 ± 3,9	5,6 ± 1,1	3,1 ± 2,1
<i>Hueso</i>	2,1 ± 0,4	2,6 ± 0,2	1,7 ± 1,4	4,5 ± 1,5	4,4 ± 2,6	6,4 ± 2,0	1,6 ± 1,3	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,7
<i>Músculo</i>	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2
<i>Hígado</i>	7,0 ± 0,5	7,1 ± 1,0	7,5 ± 0,5	13,5 ± 1,0	13,9 ± 2,1	12,9 ± 1,9	13,6 ± 7,8	15,1 ± 2,5	14,4 ± 1,1
<i>Pulmón</i>	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,7 ± 1,0	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,5	0,7 ± 0,5	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,3
<i>Estómago</i>	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
<i>Bazo</i>	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
<i>Intestino</i>	3,2 ± 0,2	3,7 ± 0,8	2,9 ± 0,3	3,9 ± 0,1	3,5 ± 0,3	2,9 ± 0,3	1,7 ± 0,6	2,3 ± 0,2	1,6 ± 0,5
<i>Riñones</i>	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1

B. Modelo de tumor *in vivo*: biodistribución en ratones que portan tumores CAPAN-1

5 Los tumores se establecieron inicialmente en ratones donantes por inyección sub-cutánea de $0,5 \times 10^6$ células CAPAN-1 en 100 μ l de PBS en el flanco de ratones nu/nu (Cancer Research-Reino Unido, Londres). Después de un periodo de 5 meses, los tumores se trocearon y se transplantaron en 24 ratones nu/nu y se dejó que crecieran durante 15 a 21 días. Se inyectó i.v. a los ratones anticuerpos radiomarcados: 0,2 MBq (1,5 μ g) para los anticuerpos marcados con ¹¹¹In y 0,4 MBq (3 μ g) para los anticuerpos marcados con ⁹⁰Y, 50 μ l/PBS. A puntos de tiempo seleccionados, se mataron grupos de 4 animales por dislocación cervical y los órganos se reseccionaron: muestras de sangre, hueso, y músculo y el tumor completo, hígado, pulmón, estómago, bazo, intestino, riñones y páncreas. Los datos se procesaron como se ha descrito anteriormente para los ratones que no portan tumor.

15 La captación por el tumor de ¹¹¹In-DTPA-AMB8LK fue $12,8 \pm 2,4\%$ de la dosis inyectada (DI) por gramo de órgano 24 horas después de la inyección. Después de 72 horas alcanzó $23,6 \pm 3,9\%$ (Tabla 3 y Fig. 12). El direccionamiento tumoral del conjugado DOTA marcado con ¹¹¹In fue inferior al del DTPA: empezando desde $8,9 \pm 2,0\%$ después de 24 horas, fue sólo $11,2 \pm 1,9\%$ de la DI/g después de tres días. Como para el conjugado DTPA marcado con ⁹⁰Y, la captación por el tumor fue $14,0 \pm 7,5\%$ de la DI/g después de 24 horas. Tuvo un pico a $18,6 \pm 1,9\%$ después de 48 horas, después declinó hasta $16,2 \pm 2,9\%$ en el último punto de tiempo de este experimento, 120 horas (Tabla 4 y Fig. 13). La captación por el tumor de ⁹⁰Y-DOTA-AMB8LK fue $14,1 \pm 1,2\%$ a las 24 horas y declinó hasta $11,2 \pm 4,5\%$ después de 120h.

20 La captación por el hígado de ambos compuestos, marcados con indio o itrio, fue muy similar a la obtenida en ratones que no portan tumor. Mostró de nuevo una captación por el hígado del conjugado DOTA más de dos veces tan alta que la de DTPA (Tablas 3 y 4 y Figs. 12 y 13).

Tabla 3: Biodistribución de Bz-DTPA- y Bz-DOTA-AMB8LK marcados con ¹¹¹In en ratones que portan tumores CAPAN-1

	<i>Bz-DTPA-AMB8LK Media ± SD, n=4</i>			<i>Bz-DOTA-AMB8LK Media ± SD, n=4</i>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>Sangre</i>	14,0 ± 1,6	12,7 ± 2,8	12,7 ± 2,8	8,6 ± 3,4	7,0 ± 3,0	4,5 ± 1,0
<i>Hueso</i>	2,0 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,6	2,2 ± 0,6	1,8 ± 0,3
<i>Músculo</i>	1,7 ± 0,5	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,7	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,1
<i>Tumor</i>	12,8 ± 2,4	17,6 ± 1,5	23,6 ± 3,9	8,9 ± 2,0	12,6 ± 3,9	11,2 ± 1,9
<i>Hígado</i>	7,2 ± 1,2	8,4 ± 2,0	8,2 ± 2,1	18,6 ± 6,3	19,7 ± 10,2	18,4 ± 4,7
<i>Pulmón</i>	2,0 ± 0,9	2,1 ± 0,7	1,6 ± 0,4	1,5 ± 1,0	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,4
<i>Estómago</i>	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<i>Bazo</i>	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 1,2
<i>Intestino</i>	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,4	3,1 ± 0,4	2,0 ± 1,0
<i>Riñones</i>	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,9 ± 0,5	2,7 ± 0,5	2,0 ± 0,3
<i>Páncreas</i>	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

5 Los valores se presentan como el porcentaje medio de la dosis inyectada por órgano (o por g de tejido para la sangre, el hueso, el músculo y el tumor) ± desviación estándar, n=4 para cada grupo.

Tabla 4: Biodistribución de Bz-DTPA- y Bz-DOTA-AMB8LK marcados con ⁹⁰Y en ratones que portan tumores CAPAN-1

	<i>Bz-DTPA-AMB8LK Media ± SD, n=4</i>			<i>Bz-DOTA-AMB8LK Media ± SD, n=4</i>		
	24h	48h	120h	24h	48h	120h
<i>Sangre</i>	22,3 ± 2,4	23,6 ± 5,3	15,4 ± 0,8	18,5 ± 10,0	11,0 ± 1,1	8,7 ± 3,5
<i>Hueso</i>	5,1 ± 1,1	4,4 ± 0,4	5,2 ± 0,8	3,8 ± 0,5	3,4 ± 0,9	2,7 ± 0,8
<i>Músculo</i>	2,1 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3
<i>Tumor</i>	14,0 ± 7,5	18,6 ± 1,9	16,2 ± 2,9	14,1 ± 1,2	12,9 ± 2,3	11,2 ± 4,5
<i>Hígado</i>	6,9 ± 0,6	6,7 ± 0,4	6,4 ± 0,3	13,6 ± 2,8	14,5 ± 4,5	11,8 ± 1,8
<i>Pulmón</i>	2,7 ± 1,0	2,1 ± 0,6	2,2 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,2
<i>Estómago</i>	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
<i>Bazo</i>	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
<i>Intestino</i>	2,9 ± 0,7	1,9 ± 0,0	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,0 ± 0,1
<i>Riñones</i>	3,4 ± 0,2	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1
<i>Páncreas</i>	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1

10 Los valores se presentan como el porcentaje medio de la dosis inyectada por órgano (o por g de tejido para la sangre, el hueso, el músculo y el tumor) ± desviación estándar, n=4 para cada grupo.

La captación de los anticuerpos radiomarcados en el estómago, bazo y páncreas fue muy baja (menos de 1% de la DI). Aunque la captación del hueso fue <5% de la DI para los dos conjugados a todos los puntos de tiempo, se observaron diferencias significativas entre la captación del DTPA-anticuerpo marcado con indio e itrio: la captación en hueso del ⁹⁰Y-DTPA-AMB8LK fue mayor que la del ¹¹¹In-DTPA-AMB8LK a los puntos de tiempo de 24 horas y 48

horas ($P < 0,001$). No ocurrió dicha diferencia entre el DOTA-anticuerpo marcado con itrio e indio: $P < 0,05$ a las 24 horas pero sin diferencia significativa a las 48 horas.

C. Formación de imágenes de ^{111}In -DTPA-AMB8LK en ratón

5 Se inyectaron i.v. a un ratón que porta tumor CAPAN-1 20 MBq de DTPA-AMB8LK marcado con ^{111}In . A los puntos de tiempo requeridos, el ratón se anestesió por inyección de ketamina/xilazina (2/1) y se formaron imágenes durante 20 minutos con un aparato NanoSPECT/CT (Bioscan). Las reconstrucciones SPECT tenían un tamaño vóxel de 0,4 mm, el CT de 0,2 mm.

10 La Figura 14 muestra algunas imágenes, en las que se indican la escala de los niveles de radiactividad y algunos de los órganos. Se aplicó corrección por desintegración para obtener todos los estudios al mismo nivel ya que la vida media del indio es 67,2 horas. 1 hora después de la inyección, la mayoría del compuesto inyectado estaba localizado en la vejiga y el corazón con una captación también importante en el hígado y los pulmones. Como puede observarse y como ya se ha observado en los experimentos de biodistribución reportados anteriormente, ocurrió una acumulación en el tumor significativa 24 horas después de inyectarse la inyección del compuesto con alguna localización todavía en el corazón y el hígado. La radiactividad en el tumor todavía está presente después de 72 horas.

D. Análisis estadístico

Los datos de biodistribución se analizaron con el software GraphPad Prism (San Diego, CA). Los datos se expresan como media \pm SD y se evalúan para significancia estadística con ANOVA de dos vías seguido de un post ensayo Bonferroni. Los criterios de significancia se ajustaron como $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $***P < 0,001$.

20 Ejemplo 9 - Evaluación *in vitro* del ADCC de AMB8LK quimérico

La actividad ADCC del anticuerpo AMB8LK quimérico se midió en el anticuerpo no marcado mostrado anteriormente, usando el protocolo siguiente: se tiñeron células CAPAN-1 con carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster, que es un reactivo para el análisis de la proliferación celular. Básicamente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre heparinizada según el Método Consenso ACTG PBMC. Las células se recogieron de la interfase de una capa de ficoll y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640. Después del último lavado, las células se transfirieron a un tubo de ensayo y se tomó un recuento de células viables. Las células se centrifugaron 800 X g durante 10 minutos y el medio RPMI se retiró. Las células se resuspendieron en 2,5 ml de una disolución 0,1% BSA/PBS a temperatura ambiente, se centrifugaron a 800 X g durante 10 minutos y el sobrenadante se decantó. Se añadieron 250 μl de una 0,1% a 0,5% BSA en PBS al sedimento celular y las células se suspendieron.

35 Las células Capan-1 se tiñeron con CFSE diluido (CarboxiFluoresceína diacetato Succinimidil Éster) durante 15 min a 37°C . Se añadió medio en un gran exceso para que el CFSE no unido forme complejos. Después, las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio completo (1 ml/ 10^6 células) que es RPMI, 10% suero AB humano, 1% L-Glutamina, 1% tampón Hepes y 1% penicilina/estreptomicina. Se usó 1 ml de células por pocillo de una placa de 24 pocillos. Se hizo la adición de PBMC a una proporción PBMC:células que varió de 5:1 a 50:1 y del anticuerpo AMB8LK (1 a 10 μg /pocillo por ejemplo). Las células se centrifugaron a velocidad baja (1.000 rpm) y se dejaron incubando durante 30 min a 37°C . Se añadió la tinción 7AAD (7-amino-actinomicina D) y las células se analizaron en un citómetro celular. Los resultados mostraron que el anticuerpo AMB8LK tiene actividad ADCC en células Capan-1.

40 Los mismos experimentos pueden llevarse a cabo con otro anticuerpo monoclonal quimérico o con moléculas semejantes a anticuerpo descritas en la presente especificación, para evaluar actividad ADCC *in vitro*.

Ejemplo 10 - Efectos terapéuticos en el crecimiento tumoral usando anticuerpos AMB8LK monoclonales quimérico radiomarcados.

45 Los anticuerpos AMB8LK monoclonales se produjeron como se muestra anteriormente en el Ejemplo I, se conjugaron como en el Ejemplo III y se radiomarcaron como en el Ejemplo IV anterior.

Determinación de DL50

50 En primer lugar, se hizo un estudio de escalada de la dosis radiactiva para determinar la DL_{50} usando 6 grupos de 4 ratones: el anticuerpo AMB8LK quimérico se radiomarca usando itrio-90 a varias actividades específicas, de manera que se inyecta en cada ratón la misma cantidad de anticuerpo: 49 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo, 86 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo, 123 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo, 185 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo y 246 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo. Después, se inyectaron al grupo I de ratones 30 μg de anticuerpo frío, al grupo II de ratones 30 μg de AMB8LK quimérico radiomarcado a una actividad específica de 49 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo (40 μCi /ratón), al grupo III de ratones 30 μg de AMB8LK quimérico radiomarcado a una actividad específica de 86 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo (70 μCi /ratón), al grupo IV de ratones 30 μg de AMB8LK quimérico radiomarcado a una actividad específica de 123 MBq de ^{90}Y /mg de anticuerpo (100 μCi /ratón), al grupo V de ratones 30 μg de AMB8LK quimérico

radiomarcado a una actividad específica de 185 MBq de $^{90}\text{Y}/\text{mg}$ de anticuerpo (150 $\mu\text{Ci}/\text{ratón}$) y al grupo VI 30 μg de AMB8LK quimérico radiomarcado a una actividad específica de 246 MBq de $^{90}\text{Y}/\text{mg}$ de anticuerpo (200 $\mu\text{Ci}/\text{ratón}$). Los ratones se pesaron dos veces a la semana, durante 8 semanas después de la inyección y el tamaño tumoral se registró dos veces a la semana. Si un ratón muere durante el periodo de observación, se realiza una autopsia para determinar si la muerte se debe a radiotoxicidad.

5

Reducción del volumen tumoral

Una vez se establece la DL_{50} , puede estudiarse la eficacia terapéutica del anticuerpo AMB8LK quimérico usando cuatro actividades específicas, todas debajo de la DL_{50} . Se inyectan 5×10^6 células CAPAN-1 en ratones Balb/c/nu/nu como se describe en un ejemplo previo para establecer tumores en ratones Balb/c/nu/nu. Una vez el tumor alcanza el volumen de 200 mm^3 , pueden empezar los experimentos. Se monitorizan cuatro grupos de 6 ratones durante 84 días y se sacrifican, si el tumor tiene un volumen de $> 1.000 \text{ mm}^3$.

10

Grupo I-se administran a los ratones 30 μg del anticuerpo monoclonal quimérico de AMB8LK de la presente invención, radiomarcado con itrio a una actividad específica n^o1.

15

Grupo II-se inyectan a los ratones 30 μg del anticuerpo monoclonal quimérico de AMB8LK de la presente invención, radiomarcado con itrio a una actividad específica n^o2.

Grupo III-se inyectan a los ratones 30 μg del anticuerpo monoclonal quimérico de AMB8LK de la presente invención, radiomarcado con itrio a una actividad específica n^o3.

Grupo IV-se inyectan a los ratones 30 μg del anticuerpo monoclonal quimérico de AMB8LK de la presente invención, radiomarcado con itrio a una actividad específica n^o4.

20

El experimento anterior muestra que existe una reducción tumoral efectiva usando los anticuerpos radiomarcados de la presente invención y actividad ADCC *in vitro* del anticuerpo AMB8LK.

Los mismos experimentos pueden llevarse a cabo con otro anticuerpo monoclonal quimérico o con moléculas semejantes a anticuerpo como se describe en la presente especificación.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, que se une a ferritina humana tanto ácida como básica, que comprende:
- (a) dos polipéptidos de cadena pesada, comprendiendo cada uno el dominio VH definido en SEQ ID NO: 4; y
- 5 (b) dos polipéptidos de cadena ligera, comprendiendo cada uno el dominio VL como se define en SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico según la reivindicación 1, en el que cada una de dichas cadenas pesadas comprende además una región constante CH1, que comprende opcionalmente una región Fc humana o una región Fc murina, y/o un péptido señal.
- 10 3. El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico según la reivindicación 2, en el que dicho péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16.
4. El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico según la reivindicación 1, en el que cada una de dichas cadenas ligeras comprende además una región constante kappa o lambda y/o un péptido señal.
5. El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico según la reivindicación 4, en el que dicha región constante kappa o lambda comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.
- 15 6. El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico según la reivindicación 4, en el que dicho péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14.
7. El anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende como una cadena ligera, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, y como una cadena pesada, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y una
- 20 región Fc humana.
8. Un fragmento funcional del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho fragmento funcional es un fragmento Fv o un fragmento Fab y en el que dicho fragmento funcional se une específicamente a ferritinas humanas tanto ácidas como básicas.
9. Un anticuerpo monoclonal biespecífico o trispecífico que comprende al menos un fragmento Fab según la
- 25 reivindicación 8, en el que al menos un fragmento Fab consiste en un polipéptido que consiste desde el extremo N al extremo C en SEQ ID NO: 2 unida directamente a SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste desde el extremo N al extremo C en SEQ ID NO: 4 directamente unida a SEQ ID NO: 6.
10. El fragmento funcional según la reivindicación 8, en el que dicho fragmento está unido a un ligando.
11. El fragmento funcional según la reivindicación 10, en el que dicho ligando es una citoquina, un receptor o
- 30 cualquier proteína de interés.
12. Una molécula scFv que consiste en un dominio VH como se define en SEQ ID NO: 4, unido a un dominio VL como se define en SEQ ID NO: 2, en el que dicha molécula scFv se une a ferritinas humanas tanto ácidas como básicas.
13. Una molécula que es un fragmento divalente que comprende al menos un dominio VH como se define en SEQ
- 35 ID NO: 4 y al menos un dominio VL como se define en SEQ ID NO: 2, en el que dicha molécula que es un fragmento divalente se une a ferritinas humanas tanto ácidas como básicas.
14. Un anticuerpo anti-ferritina monoclonal murino que se une a ferritina humana tanto ácida como básica que comprende como una cadena ligera, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12, y como una cadena pesada, desde la parte N-terminal a la parte C-terminal, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y una
- 40 región Fc murina.
15. Una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico y una molécula scFv según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un Bis-scFv que comprende al menos un scFv según la
- 45 reivindicación 12 y un fragmento divalente según la reivindicación 13, que comprende además un radioisótopo conjugado con él.
16. La molécula según la reivindicación 14, en la que dicho radioisótopo es un radioisótopo que emite alfa, beta, gamma, beta-gamma o alfa-beta.
17. Una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, un
- 50 fragmento funcional, un anticuerpo monoclonal biespecífico, un anticuerpo monoclonal trispecífico y una molécula scFv según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un Bis-scFv que comprende al menos un scFv según la

reivindicación 12 y un fragmento divalente según la reivindicación 13, que comprende además un fármaco conjugado con él.

18. La molécula según la reivindicación 17, en la que dicho fármaco es un fármaco de pirimidina.

5 19. Una composición farmacéutica que comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico o humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un fragmento funcional según la reivindicación 8, un anticuerpo monoclonal biespecífico o trispecífico según la reivindicación 9, una molécula scFv según la reivindicación 12, un Bis-scFv que comprende una molécula scFv según la reivindicación 12 y un fragmento divalente según la reivindicación 13, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 20. La composición según la reivindicación 19, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que un fármaco, materiales radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas o combinaciones de éstos se une a través de un agente quelante o un conector a dicho anticuerpo anti-ferritina monoclonal quimérico, fragmento funcional, anticuerpo monoclonal biespecífico o trispecífico, molécula scFv, Bis-scFv o fragmento divalente, para uso como un agente terapéutico.

15 21. La composición según la reivindicación 19, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, para administración simultáneamente o a intervalos específicos con una composición seleccionada del grupo de un fármaco, materiales radiactivos, toxinas, células inmunes asesinas y combinaciones de éstos, en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático, linfoma de Hodgkins, sarcoma de Kaposi y carcinoma hepatocelular.

20 22. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y que comprende opcionalmente un promotor de expresión de baculovirus o un promotor eucariota.

25 23. El vector según la reivindicación 22, en el que dicho ácido nucleico que codifica la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3 y en el que dicho ácido nucleico que codifica la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 1.

24. Células transformadas con un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 en el que dichas células se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, *E. coli*, células de levadura, células VERO, células HELA, células COS, células CR: 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, A549, PC12, K562, células 293, células Sf9 y células Cv1.

30 25. Células transformadas con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena ligera según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, seleccionadas en particular del grupo que consiste en células CHO, *E. coli*, células de levadura, células VERO, células HELA, células COS, células CR: 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3, A549, PC12, K562, células 293, células Sf9 y células Cv1.

35 26. Las células según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, en las que dicho ácido nucleico que codifica la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 3, y en las que dicho ácido nucleico que codifica la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 1.

ES 2 541 907 T3

CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CTA GGG	48
Q I V L T Q S P A I L S A S L G	16
FR1	
GAG GAG ATC ACC CTA ACC TGC AGT GCC AGC TCG AGT GTA ACT TTC ATG	96
E E I T L T C S A S S S V T F M	32
FR1 CDR1	
CAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACT TCT CCC AAA CTC TTG ATT TAT	144
H W Y Q Q K S G T S P K L L I Y	48
FR2	
ACC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT TCT CGC TTC AGT GGC AGT	192
T T S N L A S G V P S R F S G S	64
CDR2 FR3	
GGG TCT GGG ACC TTT TAT TCT CTC ACA ATC AGC AGT GTG GAG GCT GAA	240
G S G T F Y S L T I S S V E A E	80
FR3	
GAT GCT GCC GAT TAT TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG TTC	288
D A A D Y Y C H Q W S S Y P T F	96
FR3 CDR3	
GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG	318
G S G T K L E I K R	106
FR4	

Fig. 1

ES 2 541 907 T3

Q	V	Q	L	K	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	18
CAG	GTG	CAG	CTG	AAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGC	CTG	GTG	GCA	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	54
FR1																		
S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	S	R	Y	S	V	H	W	36
TCC	ATC	ACA	TGC	ACT	GTC	TCT	GGG	TTC	TCA	TTA	TCC	AGA	TAT	AGT	GTA	CAC	TGG	108
FR1						CDR1						FR2						
V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	G	T	I	W	G	G	54
GTT	CGC	CAG	CCT	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG	GGA	ACG	ATA	TGG	GGT	GGT	162
FR2										CDR2								
G	S	T	D	Y	N	S	V	L	K	S	R	L	S	I	S	K	D	72
GGA	AGC	ACA	GAC	TAT	AAC	TCA	GTT	CTC	AAA	TCC	AGA	CTG	AGC	ATC	AGC	AAG	GAC	216
CDR2						FR3												
N	S	K	S	Q	V	L	L	K	V	N	S	L	Q	T	D	D	T	90
AAC	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTG	TTA	AAA	GTG	AAC	AGT	CTA	CAA	ACT	GAT	GAC	ACA	270
FR3																		
A	I	Y	Y	C	A	S	G	P	Y	Y	Y	T	M	D	Y	W	G	108
GCC	ATA	TAT	TAC	TGT	GCC	AGT	GGT	CCT	TAT	TAC	TAT	ACT	ATG	GAC	TAC	TGG	GGT	324
FR3						CDR3												
Q	G	T	S	V	T	V	S	S										117
CAA	GGA	ACC	TCA	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA										351
FR4																		

Fig. 2

GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	48
A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	16
AGC	ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	96
S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	32
TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	144
F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	48
GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	192
G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	64
CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	240
L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	80
TAC	ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	288
Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	96
AAA	GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	336
K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	112
CCA	TGC	TAA														345
P	C	*														115

Fig. 3

GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	48
A	S	T	K	G	P	S	V	F	F	L	A	P	S	S	K	16
AGC	ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	96
S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	32
TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	144
F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	48
GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	192
G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	64
CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	240
L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	80
TAC	ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	288
Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	96
AAA	GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	336
K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	112
CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC	TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	384
P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	128
AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	432
K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	144
GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	480
V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	160
TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	528
Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	176
GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	576
E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	192
CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	624
H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	208
AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	672
K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	224
CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	720
Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	240
CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	768
L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	256
CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	816
P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	272
AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	864
N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	288
CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	912
L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	304
GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	960
V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	320
CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TAA						990
Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K	*						330

Fig. 4

ES 2 541 907 T3

GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCG	CCC	TGC	TCC	AGG	48
A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	16
AGC	ACC	TCC	GAG	AGC	ACA	GCC	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	96
S	T	S	E	S	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	32
TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	144
F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	48
GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	192
G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	64
CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACG	AAG	ACC	240
L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T	80
TAC	ACC	TGC	AAC	GTA	GAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	288
Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	96
AGA	GTT	GAG	TCC	AAA	TAT	GGT	CCC	CCA	TGC	CCA	TCA	TGC	CCA	GCA	CCT	336
R	V	E	S	K	Y	G	P	P	C	P	S	C	P	A	P	112
GAG	TTC	CTG	GGG	GGA	CCA	TCA	GTC	TTC	CTG	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	384
E	F	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	128
GAC	ACT	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACG	TGC	GTG	GTG	GTG	432
D	T	L	M	I	S	R	T	F	E	V	T	C	V	V	V	144
GAC	GTG	AGC	CAG	GAA	GAC	CCC	GAG	GTC	CAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAT	480
D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y	V	D	160
GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TTC	528
G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	176
AAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	576
N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	192
TGG	CTG	AAC	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GGC	CTC	624
W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	208
CCG	TCC	TCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	672
P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	224
GAG	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CAG	GAG	GAG	ATG	ACC	AAG	720
E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	240
AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAC	CCC	AGC	GAC	768
N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	256
ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	816
I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	272
ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	864
T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	288
AGG	CTA	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	GAG	GGG	AAT	GTC	TTC	TCA	912
R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S	304
TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACA	CAG	AAG	AGC	960
C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	320
CTC	TCC	CTG	TCT	CTG	GGT	AAA	TAA									981
L	S	L	S	L	G	K	*									327

Fig. 5

ACG	GTG	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	48
T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	16
TTG	AAA	TCT	GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	96
L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	32
CCC	AGA	GAG	GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	144
P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	48
GGT	AAC	TCC	CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	192
G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	64
TAC	AGC	CTC	AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	240
Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	80
CAC	AAA	GTC	TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AGT	TCG	CCC	288
H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	96
GTC	ACA	AAG	AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT	TAA						321
V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	*						107

Fig. 6

ATG	GAC	ATG	CGT	GTG	CCC	GCT	CAA	CTC	CTG	GGC	CTG	CTG	CTG	CTC	TGG	48
M	D	M	R	V	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	W	16
CTC	CCA	GGT	GCG	CGC	TGT											66
L	P	G	A	R	C											22

Fig. 7

ATG	GAG	TTC	GGC	CTG	AGC	TGG	CTG	TTC	CTG	GTG	GCT	ATT	CTT	AAG	GGT	48
M	E	F	G	L	S	W	L	F	L	V	A	I	L	K	G	16
GTC	CAG	TGT														57
V	Q	C														19

Fig. 8

GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGA
CTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCGGATCCCTGTC
CAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTA
ACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGG
ACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAAATGCCAGCACCTAACCT
CTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCC
ATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACA
ACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAG
TGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGAC
CTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCT
TGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCC
TGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTC
CTGGACTCTGATGGTCTTACTTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAA
ATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACAGACTAAGAGCTTCTCCCGGAC
TCCGGGTAAATGAGCTCAGCACCCACAAAACCTCTCAGGTCCAAAGAGACACCCACACTCATCTCCATGCT
TCCCTTGATAAATAAAGCACCCAGCAATGCCTGGGACCATGTAA

Fig. 9A

AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD
LYTLSSSVIVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGG
PSVFI FPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYN
STLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE
MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNW
VERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Fig. 9B

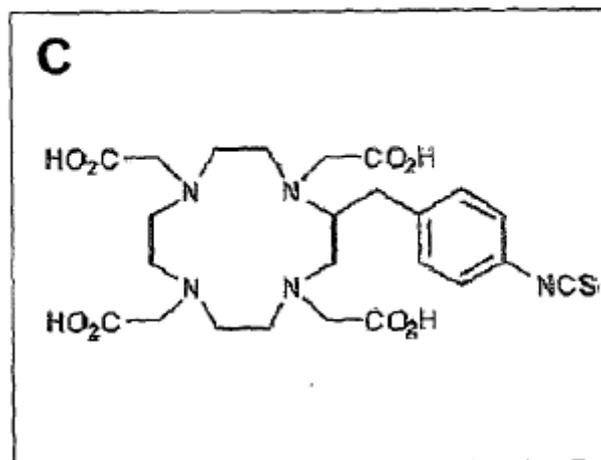
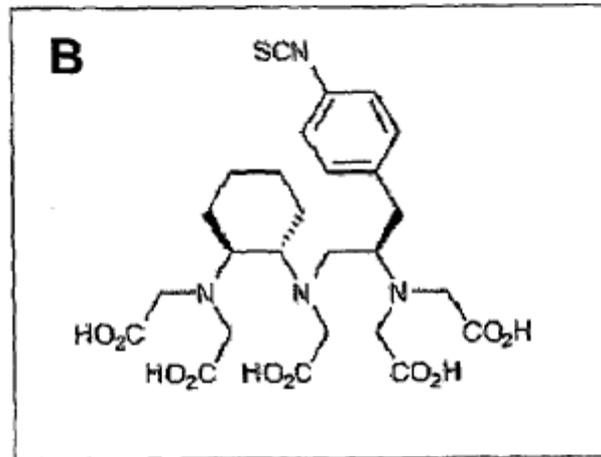
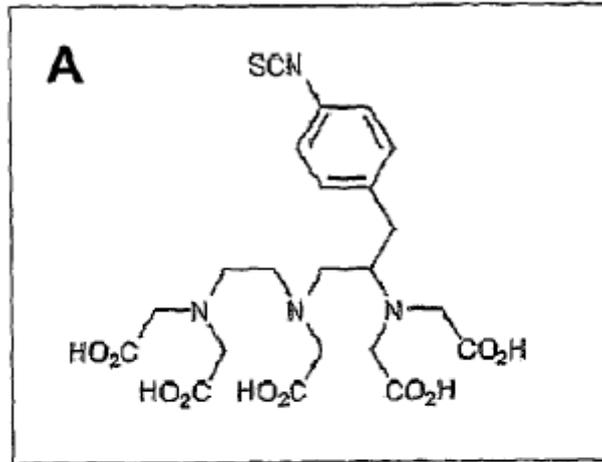


Fig. 10

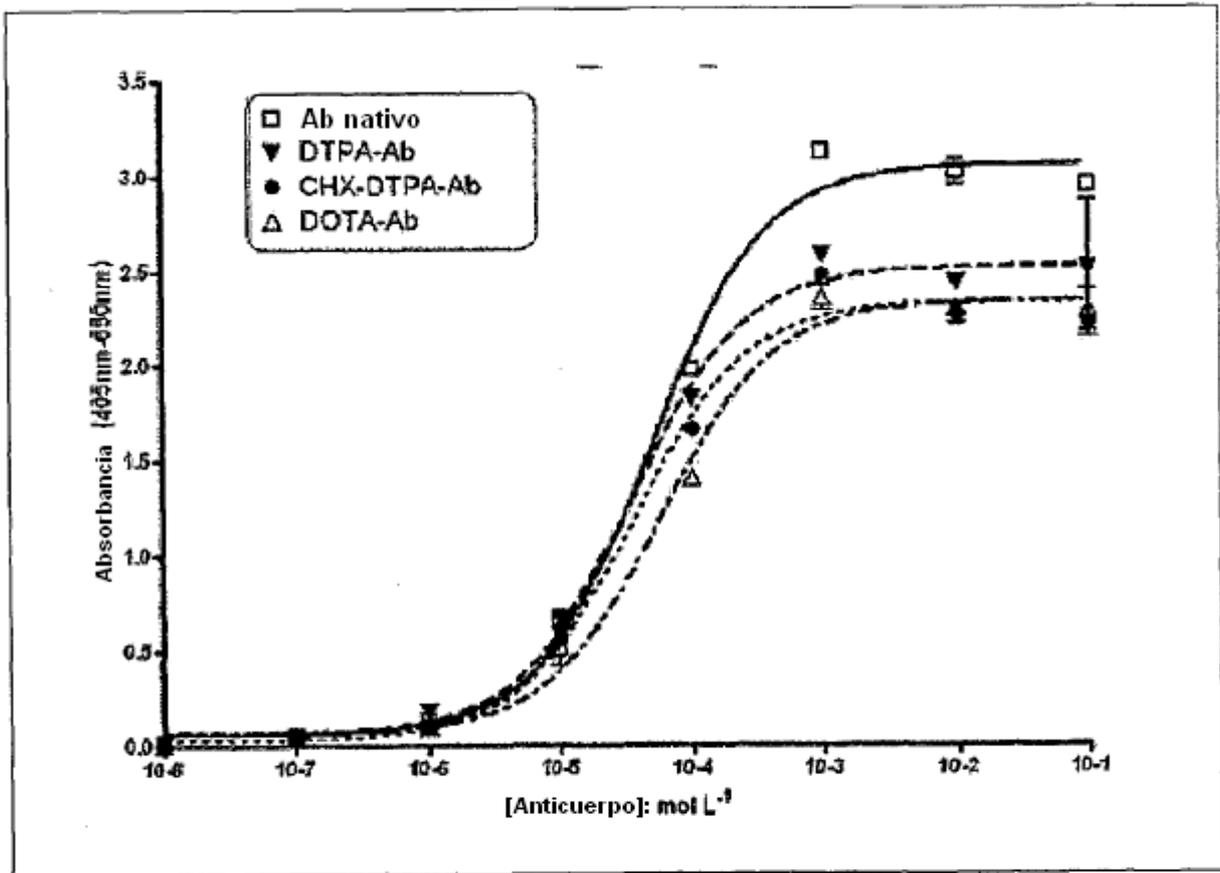


Fig. 11

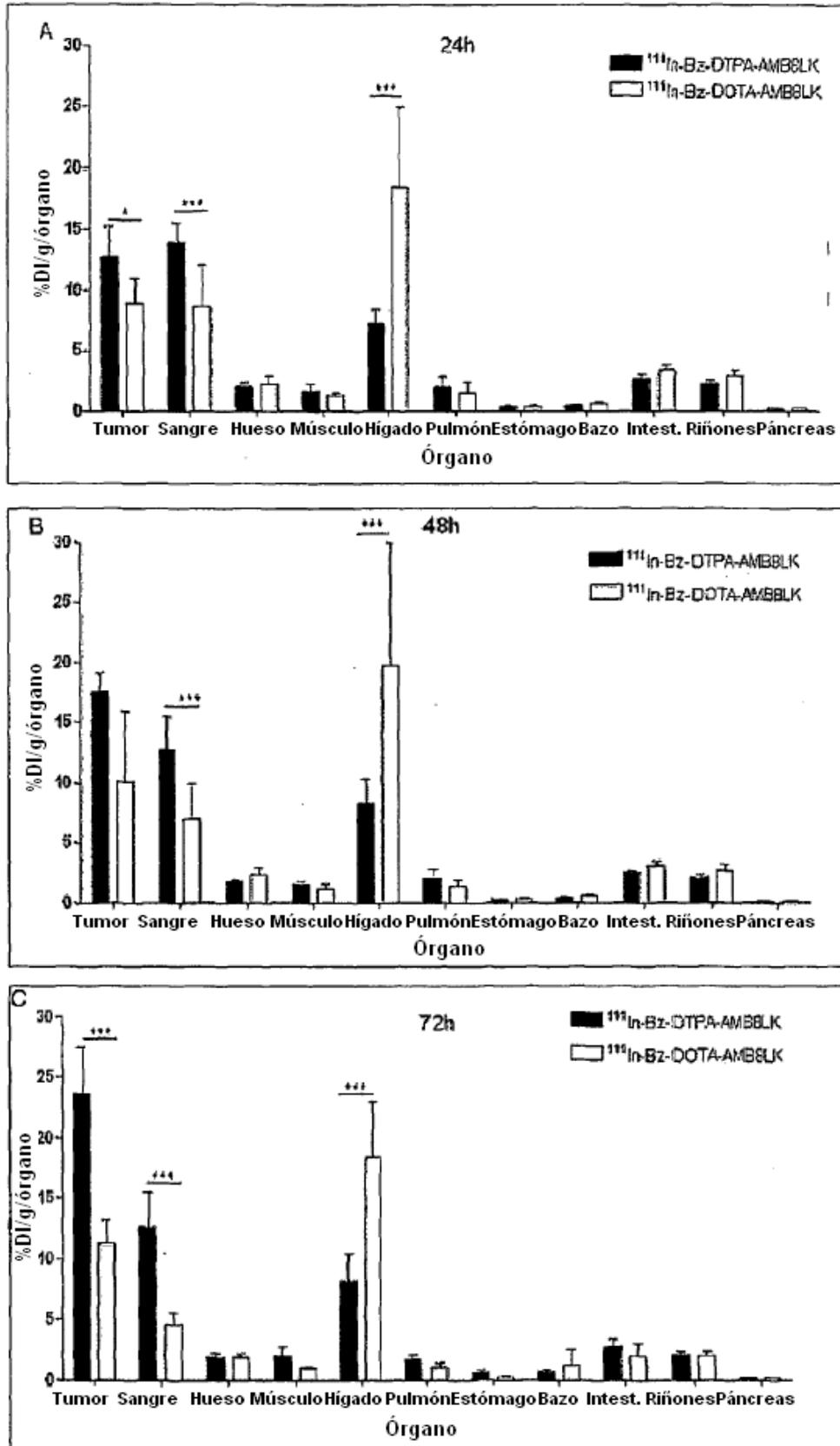


Fig. 12

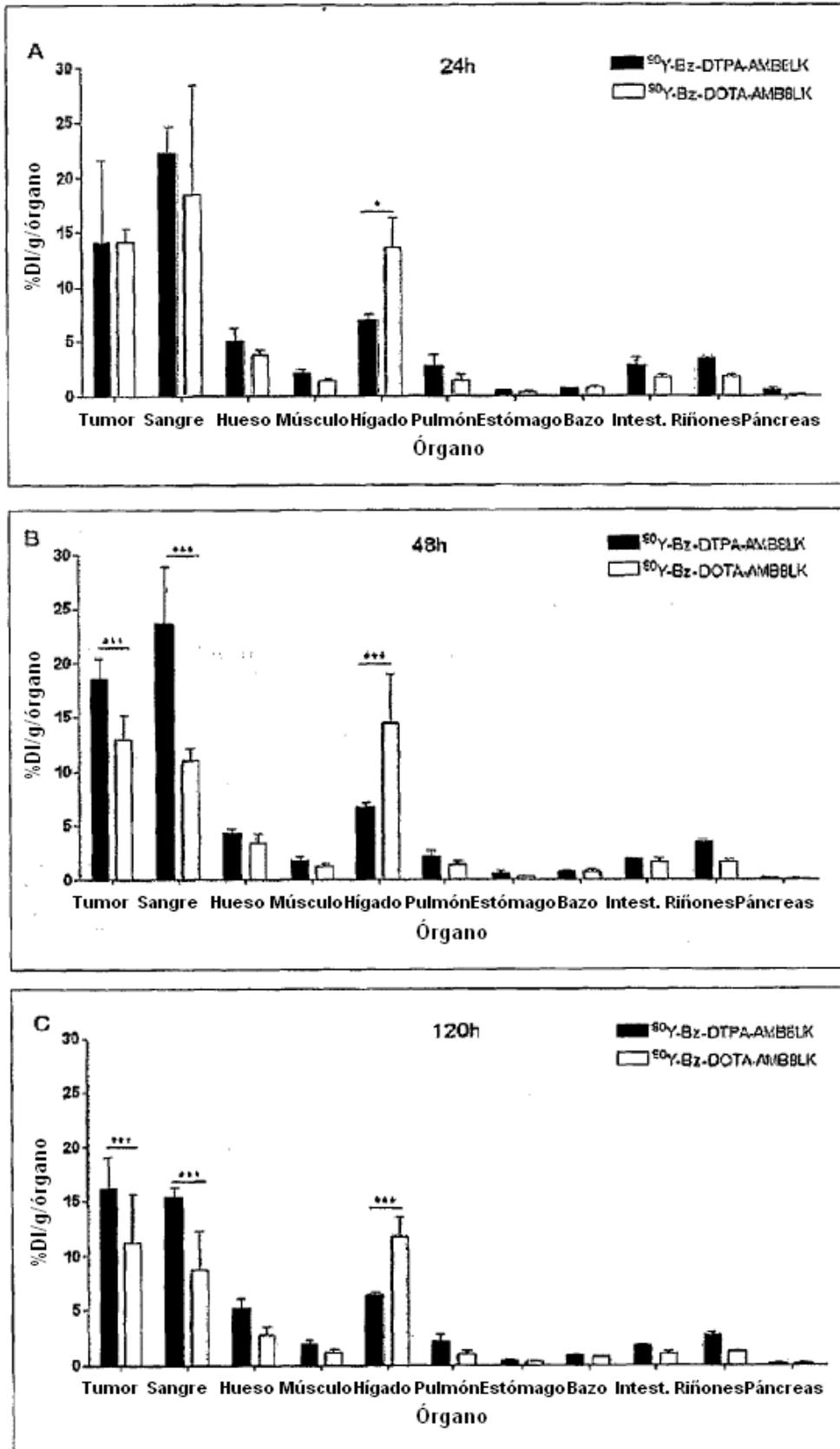


Fig. 13

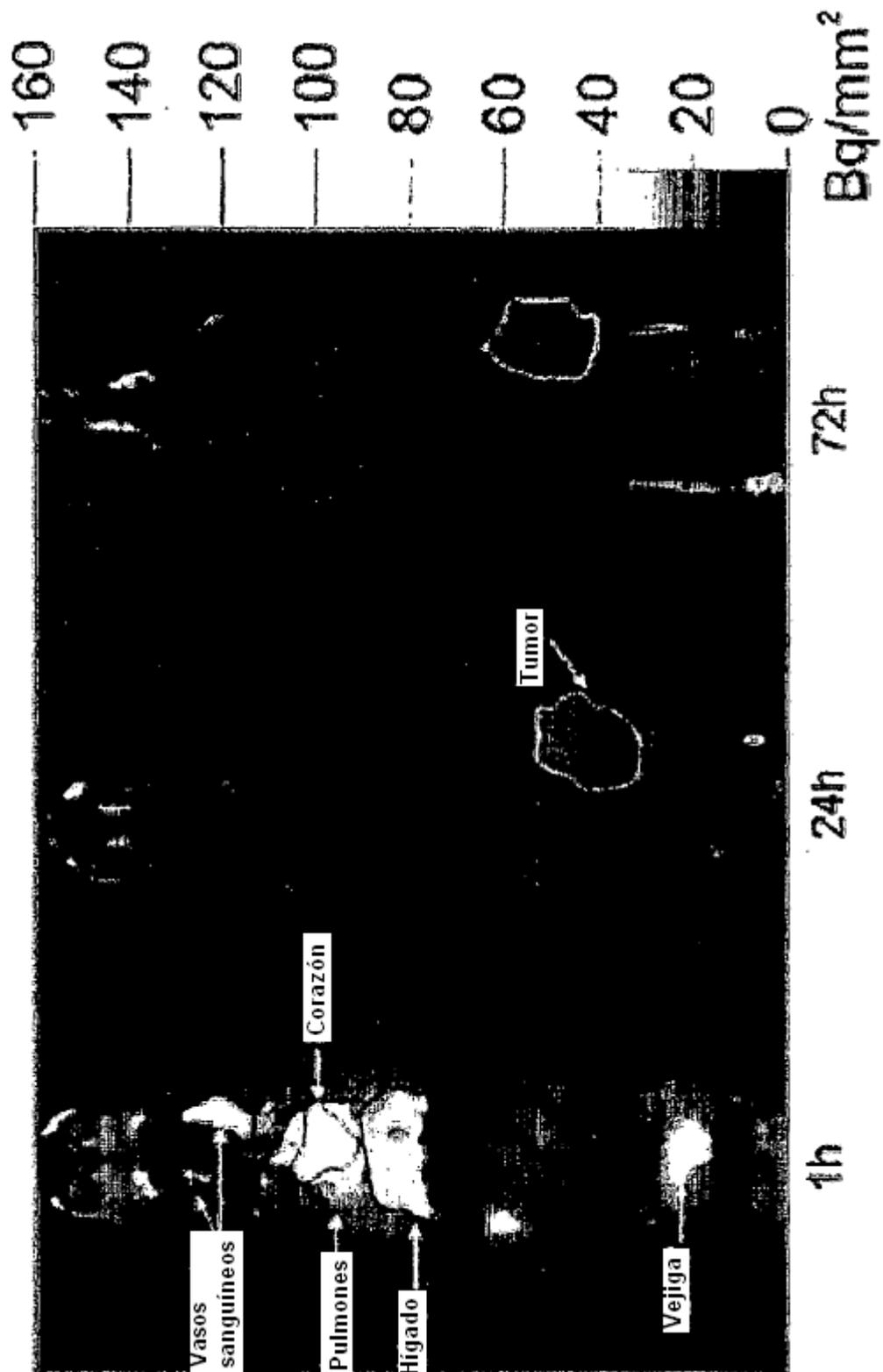


Fig. 14

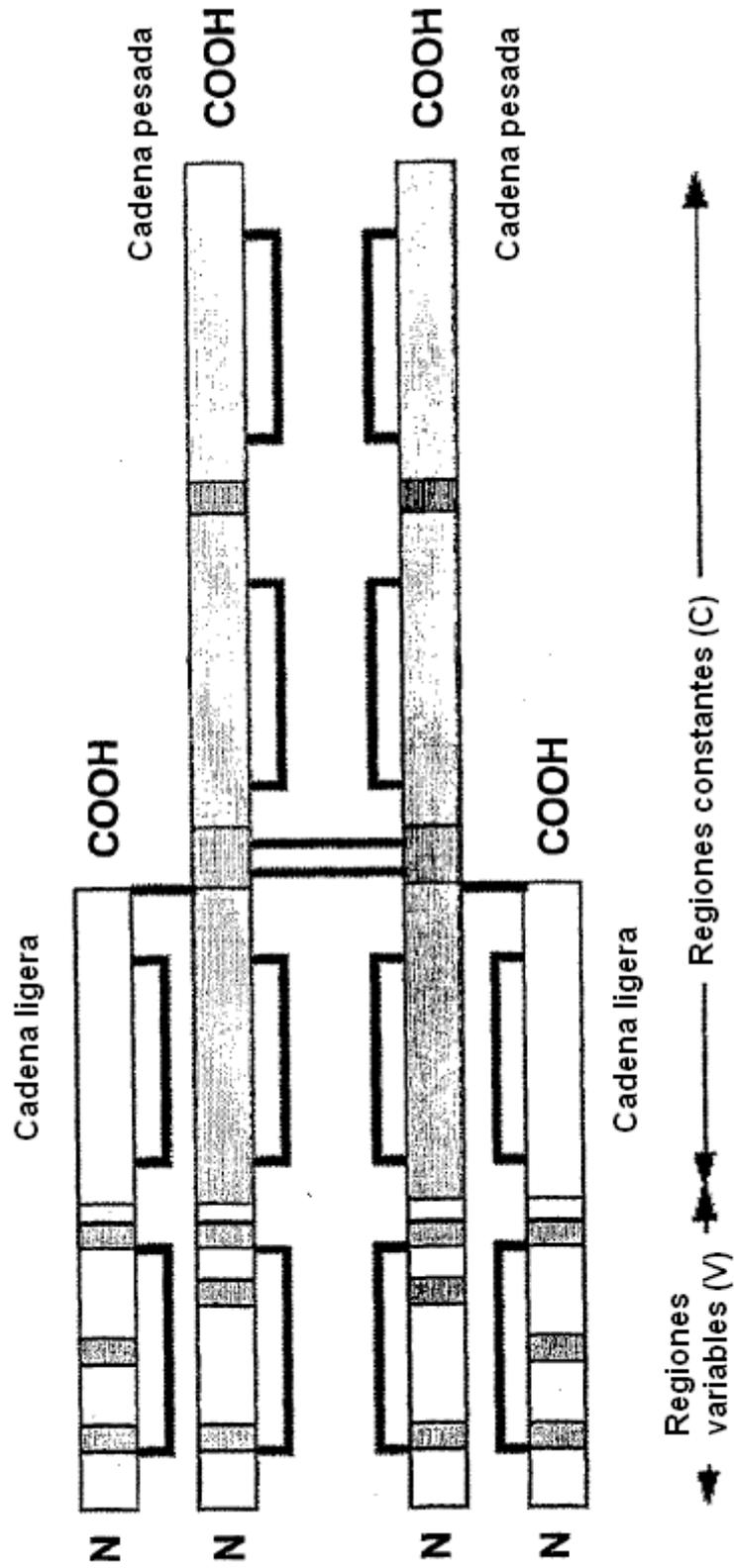


Fig. 15