(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 654 065**

(51) Int. CI.:

C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2005 PCT/IT2005/000078**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2005 WO05082938**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2005 E 05718988 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 1718678**

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal anti-tenascina humana**

(30) Prioridad:

27.02.2004 IT RM20040105

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2018

(73) Titular/es:

ALFASIGMA S.P.A. (100.0%)
Viale Sarca, 223
20126 Milano, IT

(72) Inventor/es:

DE SANTIS, RITA;
PELLICCIA, ANGELA;
PALOMBO, GIOVANNA y
CARMINATI, PAOLO

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-tenascina humana

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-tenascina humana, a métodos y materiales para obtenerlos, al uso de dichos anticuerpos en procedimientos de diagnóstico y tratamiento para tumores que expresan tenascina, y a materiales que contienen dichos anticuerpos adecuados para su uso en el campo médico.

Antecedentes de la invención

La especificidad de la terapia tumoral a menudo constituye un factor limitante para determinar el éxito del tratamiento. De hecho, la aparición de efectos tóxicos y la tolerabilidad reducida de una serie de agentes anticáncer limita su uso y la calidad de vida de los pacientes.

La reducción de la toxicidad está directamente relacionada con la selectividad del tratamiento para las células del cáncer exclusivamente. Los anticuerpos monoclonales son el instrumento ideal para localizar específicamente el tumor y, cuando se combinan con el sistema de amplificación de avidina/biotina, constituyen un método extremadamente potente para dirigir moléculas activas al sitio tumoral.

La tenascina es una molécula de la matriz extracelular, que se expresa durante la embriogénesis y en tejidos adultos durante los procesos de formación de cicatrices y de desarrollo tumoral, así como en vasos sanguíneos recién formados. La tenascina está prácticamente ausente en tejidos adultos normales, mientras que es expresada en el estroma de muchos tumores sólidos, tales como gliomas (Burdon, *et al.*, Cancer Res., 43:2796-2805, 1983), carcinomas de mama (Chiquet-Ehrismann, *et al.*, 1986), pulmón (Natali, *et al.*, Intl. J. Cancer, 54:56-68, 1989), fibrosarcomas y carcinomas de células escamosas (Ramos, D.M. *et al.*, Intl. J. Cancer, 75:680-687, 1998). La tenascina se expresa en gliomas, pero no en el correspondiente tejido cerebral normal. Para un análisis profundo acerca de la tenascina, se remite al documento de WO 92/04464, Wistar, y referencias relacionadas.

Basándose en el documento EP 0 496 074, G. Paganelli *et al.* han desarrollado un método denominado "prelocalización en tres etapas" para el tratamiento sistémico y locorregional de tumores, cuyos resultados se ofrecen en: Cremonesi, M., *et al.*, Eur. J. Nucl. Med., 26(2):110-120, 1999; Paganella, G., *et al.*, Eur. J. Nucl. Med., 26(4):348-357, 1999; Paganelli, G., *et al.*, Cancer Biother. & Radiopharm., 16(3):227-235, 2001; Grana, C., *et al.*, Br. J. Cancer, 86:207-212, 2001.

Otras referencias para este tipo de tratamiento del cáncer son los documentos WO 94/04702 y US 5.578.287.

El tratamiento de prelocalización en tres etapas, también conocido con la marca comercial PAGRIT®, se basa en la administración intravenosa secuencial de un anticuerpo monoclonal anti-tenascina biotinilado, estreptavidina y ^{90}Y-biotina, y administraciones de avidina y albúmina biotinilada que se realizan antes de la estreptavidina y ^{90}Y-biotina, respectivamente (etapa de "persecución"), para reducir los niveles en circulación del anticuerpo y de la estreptavidina. La selectividad del método de prelocalización en tres etapas es debida al uso del anticuerpo monoclonal anti-tenascina. La localización de moléculas de la matriz extracelular presenta la ventaja, comparada con la localización dirigida a antígenos de la superficie celular, de que no se ve afectada por la modulación de la expresión del antígeno por la propia célula tumoral. Las dosis, los momentos de la administración y las "persecuciones" del tratamiento de prelocalización se han establecido con el fin de obtener unas proporciones óptimas de biodistribución de tumor a no tumor.

Los resultados obtenidos en 48 pacientes que padecen glioblastoma (GBM) o astrocitoma anaplásico (AA), introducidos en el estudio por Paganelli (Paganelli, G., *et al.*, Eur. J. Nucl. Med., 26(4):348-357, 1999), han demostrado una falta sustancial de toxicidad, excepto para una serie de casos de reacción alérgica a la estreptavidina, y una eficacia preliminar del tratamiento. De hecho, dos meses después del final del tratamiento, 25% de los pacientes mostraron una reducción en la masa del tumor (respuesta completa = 6%, respuesta parcial = 11%, respuesta pequeña = 8%), y 52% de los pacientes permanecieron estables, con una tasa de respuesta global del 77%. En una serie de estos pacientes, cuyas expectativas de vida estaban por debajo de seis meses, la respuesta al tratamiento persistió durante más de un año.

El papel del anticuerpo anti-tenascina biotinilado consiste en trasladarse al tumor y mediar, a través de la molécula biotinilada, en la acumulación de avidina y, posteriormente, de ^{90}Y-biotina, que dirigen los radioisótopos directamente hacia el interior del tumor. Los anticuerpos anti-tenascina ya son el objeto de patentes y solicitudes de patente: documento US 5.624.659, Duke University; documento JP 2219590, Rikagaku; documento WO 92/04464, Wistar; y documento WO 03/072608, Sigma-Tau.

Un anticuerpo anti-tenascina concreto se describe en: Siri, A., *et al.*, Nucl. Acid Res., 19(3):525-531, 1991; Balza, E., *et al.*, FEBS 332:39-43, 1993; y su uso para fines terapéuticos se describe en: Riva, P., *et al.*, Acta Oncol., 38(3):351-359, 1999; Riva, P., *et al.*, Cancer, 80(12):2733-2742; 1997; Riva, P., *et al.*, Int. J. Cancer, 5:7-13, 1992.

El clon utilizado para la generación de dicho anticuerpo en los estudios citados anteriormente se denomina BC-2. El solicitante ha demostrado que el clon BC-2 no resulta adecuado para un desarrollo industrial, porque produce una

cadena ligera no funcional adicional (que probablemente se deriva de la línea de mieloma parental) cuyo nivel de expresión aumenta durante el desarrollo del proceso de producción a gran escala, evitando la purificación a escala industrial del anticuerpo.

Por tanto, es necesario un anticuerpo monoclonal anti-tenascina que pueda producirse a escala industrial con los niveles de pureza requeridos para un uso farmacéutico.

La solicitud de patente previa WO 03/072608, presentada en nombre de Sigma Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., describe la generación del anticuerpo anti-tenascina ST2146 sin la cadena ligera no funcional adicional, capaz de reconocer un epitopo antigénico compartido con el anticuerpo BC-4, que también está contaminada por una cadena ligera no funcional.

El anticuerpo ST2485, el objeto de la presente invención, reconoce un epitopo parcialmente compartido con el de BC-2, y, por tanto, localizado en la misma región de la proteína. Esta región es expresada en gran medida en diversos tejidos tumorales. Por tanto, es importante conseguir un anticuerpo monoclonal homogéneo que sea específico para esta región, para ser empleado para el diagnóstico o la localización en cánceres.

Además, la presente invención demuestra que el anticuerpo ST2485 presenta la ventaja de unirse a la tenascina además del anticuerpo ST2146, proporcionando así métodos de prelocalización útiles que implican el uso combinado de los dos anticuerpos.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto un anticuerpo monoclonal anti-tenascina humana que resuelve los problemas mencionados anteriormente, puesto que no posee una cadena ligera no funcional y presenta la ventaja de la aditividad cuando se emplea en combinación con otro anticuerpo anti-tenascina. Este anticuerpo es el objeto de la presente invención, junto con el método para obtenerlo y su uso en terapia, en particular para la preparación de un producto útil para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión de tenascina, tales como, por ejemplo, tumores.

La presente invención se refiere al anticuerpo y a fragmentos del anticuerpo, que opcionalmente contienen marcadores y agentes de diagnóstico adicionales, a procesos para obtener dicho anticuerpo y fragmentos de anticuerpo, a composiciones farmacéuticas que contienen dicho anticuerpo y sus fragmentos, y a métodos de diagnóstico y terapéuticos para emplearlos, así como a kits útiles para poner en práctica dichos métodos.

La presente invención también se refiere al ADN que codifica dicho anticuerpo o sus fragmentos, a vectores que contienen dicho ADN, a células hospedantes que contienen dichos vectores, a la proteína codificada por las secuencias de nucleótidos SEQ ID 1 y SEQ ID 2, y al ADN que codifica la proteína y los fragmentos. En particular, el objeto de la presente invención también es el hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo que es el objeto de la presente invención se caracteriza por las secuencias de la región variable de las cadenas ligera y pesada SEQ ID 1 y SEQ ID 2, respectivamente, mostradas en las figuras 17 y 18. Para abreviar, el anticuerpo que es el objeto de la presente invención se identificará con el nombre de ST2485. También pueden producirse fragmentos de ST2485 o sus derivados quiméricos o recombinantes y emplearse dentro del alcance de la presente invención. También son objetos de la presente invención los fragmentos proteolíticos de dicho anticuerpo capaces de unirse a un epitopo antigénico dentro de la región A1-4-D de la tenascina humana. A lo largo de la descripción de la presente invención, los fragmentos de anticuerpo significan fragmentos capaces de unirse a un epitopo antigénico dentro de la región A1-4-D de la tenascina C humana.

Según la presente invención, dicho anticuerpo o los fragmentos proteolíticos están preferiblemente biotinilados.

Otro objeto de la presente invención consiste en la línea celular de hibridoma denominada cST2485, que produce el anticuerpo ST2485.

La línea celular de hibridoma ha sido depositada en Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rossana Benzi 10, Génova, Italia, el 12 de noviembre de 2003 según las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de depósito PD03003.

También son objetos de la presente invención los derivados recombinantes del anticuerpo ST2485, que pueden estar opcionalmente biotinilados. En particular, los derivados recombinantes preferidos son aquellos en los que la región constante murina está reemplazada por su homóloga humana (Ferrer, C., *et al.*, J. Biotechnol., 52:51-60, 1996), o aquellos en los que la región constante murina está reemplazada por un componente biológicamente activo, tal como, por ejemplo, un miembro de la familia de la avidina (Penichet M.L., Manuel, L., *et al.*, J. Immunol., 163:4421-4426, 1999), un factor de crecimiento útil para estimular a los efectores inmunológicos dirigidos a tumores (por ejemplo, G-CSF, GM-CSF), o aquellos en los que la región constante murina está reemplazada por un componente farmacológicamente activo, tal como, por ejemplo, un superantígeno, una toxina, una citoquina o cualquier otra proteína útil para potenciar la eficacia terapéutica anticáncer (Di Massimo, A.M., *et al.*, British J. Cancer, 75(6):822-828, 1997; Parente D., *et al.*, Anticancer Research, 17(6A):4073-4074, 1997). Los métodos para obtener dichos derivados son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Otro objeto de la presente invención consiste en derivados conjugados del anticuerpo ST2485, opcionalmente biotinilado.

En particular, los derivados conjugados preferidos son aquellos en los que el componente biológicamente activo está unido al anticuerpo por medio de sistemas convencionales. Los ejemplos de compuestos biológicamente activos son los miembros de la familia de la avidina, un factor de crecimiento útil para estimular a los efectores inmunológicos dirigidos a tumores (por ejemplo, G-CSF, GM-CSF), o aquellos en los que la región constante murina está reemplazada por un componente farmacológicamente activo, tal como, por ejemplo, un superantígeno, una toxina, una citoquina o cualquier otra proteína útil para potenciar la eficacia terapéutica anticáncer, fármacos anticáncer y radioisótopos.

Otro objeto de la presente invención consiste en el uso del anticuerpo, o su derivado, para la preparación de un producto farmacéutico útil en un método para la radioinmunoterapia del cáncer, realizado preferiblemente según el método denominado prelocalización en tres etapas, también conocido con la marca comercial PAGRIT®, que incluye la administración, a un sujeto que padece un cáncer que expresa tenascina, del anticuerpo ST2485, o sus fragmentos proteolíticos, preferiblemente biotinilado.

Los derivados recombinantes del anticuerpo que es el objeto de la presente invención y sus conjugados pueden emplearse de modo ventajoso en la terapia del cáncer. Por tanto, el uso del anticuerpo y sus fragmentos o derivados para la preparación de una medicina para el tratamiento de tumores que expresan tenascina constituye otro objeto de la presente invención.

Con el fin de poner en práctica una radioinmunoterapia se describen también dos kits terapéuticos, uno sistémico y el otro locorregional. Estos kits también se conocen con la marca comercial PAGRIT®. El kit sistémico consiste en 5 viales, que incluyen el vial 1 que contiene el anticuerpo biotinilado o sus fragmentos o derivados según la presente invención; el vial 2 que contiene avidina; el vial 3 que contiene estreptavidina; el vial 4 que contiene albúmina humana biotinilada; y el vial 5 que contiene biotina DOTA (o los derivados de biotina descritos en el documento WO 02/066075). Los kits locorregionales consisten en 3 viales, que se corresponden con los viales1, 2 y 5 del kit sistémico. Los viales se preparan de modo que sean adecuados para la inyección en el sujeto que se va a tratar, preferiblemente un sujeto humano. Con el fin de poner en práctica una radioinmunoterapia se describe un método denominado IART ("Intraoperative Avidination for Radionuclide Treatment", avidinación intraoperatoria para el tratamiento con radionúclidos), basada en el tratamiento intraoperatorio de pacientes que se someten a la retirada quirúrgica de masas tumorales con los reactivos que son el objeto de la presente invención, tanto solos como en combinación con otros componentes del kit PAGRIT®.

El recipiente específico, preferiblemente en forma de un vial adecuado para la inyección que contiene el anticuerpo o sus fragmentos en forma biotinilada, constituye otro objeto de la presente invención.

Según una realización de la presente invención, en los kits terapéuticos, el anticuerpo biotinilado se combina con otros anticuerpos anti-tenascina, preferiblemente dirigidos a la región similar a EGF de la proteína. Como alternativa, el anticuerpo biotinilado puede acoplarse con otros anticuerpos específicos del tumor. Puede encontrarse una descripción general de este tipo de método en el documento EP 0 496 074, European Journal of Nuclear Medicine, vol. 26, n.º 4, abril, 1999, 348-357, documento US 5.968.405.

Otro objeto de la presente invención es el uso del anticuerpo monoclonal ST2485 para obtener imágenes para posteriores objetivos de diagnóstico ("formación de imágenes") por medio de inmunolocalización *in vivo* en el tumor.

Otro objeto de la presente invención es el uso del anticuerpo monoclonal ST2485 en combinación con un segundo anticuerpo anti-tenascina en un ensayo para la producción de un kit de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de tenascina.

Estos y otros objetos de la presente invención se describirán con más detalle a continuación, también con la ayuda de los ejemplos y las figuras.

Breve descripción de la figuras

Figura 1: Representación esquemática de la tenascina C humana y de la estrategia adoptada para generar el anticuerpo similar a BC-2.

Figura 2: Análisis de SDS-PAGE (a, b) y transferencia Western (c, d) del anticuerpo ST2485 en condiciones reductoras y no reductoras. En condiciones reductoras, se observa una banda doble al nivel de la cadena ligera del anticuerpo (b, d).

Figura 3: Análisis de SDS-PAGE del anticuerpo ST 2485 sometido a una desglicosilación mediante digestión con la enzima PNGasa F (péptido-N-glicosidasa de *Flavobacterium*): se observa la desaparición de la banda de cadena ligera de alto peso molecular.

Figura 4: Perfiles de cromatografía de hidroxiapatito de los anticuerpos ST2485 y BC-2.

Figura 5: Especificidad de unión de ST2485 con la tenascina humana y con el fragmento Tn ($A_{(1-4)}$-D) mediante un análisis de la transferencia Western.

Figura 6: ELISA competitivo entre ST2485 y BC-2 por la unión a la tenascina C (a) o al fragmento Tn ($A_{(1-4)}$-D) (b).

Figura 7: Inmunorreactividad de ST2485 comparado con BC-2 con la tenascina C (a) y con el fragmento Tn ($A_{(1-4)}$-D) (b).

Figura 8: Inmunorreactividad de ST2485 y BC-2 biotinilados con la tenascina C (a) y con el fragmento Tn ($A_{(1-4)}$-D) (b).

Figura 9: Reactividad cruzada del anticuerpo ST2485 con la tenascina murina expresada en el tumor LMM3 (cáncer de mama murino) y en intestino murino normal.

Figura 10: Protocolo adoptado para el estudio de biodistribución de ST2485 en ratones atímicos ("nude").

Figuras 11 y 11a: Biodistribución de ST2485 a diversas dosis de administración, comparado con BC-2. La acumulación de ST2485 en el tumor, a las dosis administradas, es al menos el doble que la de BC-2.

Figuras 12 y 12a: Proporciones de tumor a no tumor de ST2485 comparado con BC-2. Estas proporciones son mayores para el anticuerpo ST2485 a todas las dosis administradas.

Figura 13: Ensayo de la interferencia (a) y la aditividad (b) *in vitro* de los anticuerpos anti-tenascina ST2485 y ST2146 mediante un ensayo ELISA.

Figuras 14 y 14a: Ensayo de aditividad *in vitro* de los anticuerpos ST2485 y ST2146 mediante un ensayo BiaCore.

Figura 15: Esquema adoptado en el estudio de aditividad *in vivo* de los anticuerpos ST2485 y ST2146.

Figura 16: Aditividad *in vivo* de los anticuerpos ST2485 y ST2146 expresada en ng de anticuerpo localizado por gramo de tumor.

Figura 17: Secuencia SEQ ID 1 de la región variable de la cadena ligera de ST2485 (VL).

Figura 18: Secuencia SEQ ID 2 de la región variable de la cadena pesada de ST2485 (VH).

Descripción detallada de la invención

Los inventores han preparado un nuevo anticuerpo anti-tenascina humana denominado ST2485, cuyas secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada son SEQ ID 1 y SEQ ID 2, respectivamente, producido a partir de la línea celular de hibridoma cST2485. El anticuerpo es capaz de unirse a un epitopo antigénico dentro de la región $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana.

Los fragmentos proteolíticos del anticuerpo según la presente invención son capaces de unirse a un epitopo antigénico dentro de la región $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana.

Los derivados recombinantes del anticuerpo según la presente invención se obtienen según métodos convencionales que son conocidos por los expertos en la técnica. Los derivados recombinantes preferidos son aquellos en los que la región constante murina está reemplazada por su homóloga humana, o por un componente biológica o farmacológicamente activo, o por un miembro de la familia de la avidina.

Según la presente invención, los derivados conjugados se obtienen por medio de métodos convencionales muy conocidos en este campo.

Los derivados conjugados preferidos son aquellos en los una porción biológicamente activa está unida al anticuerpo. Los ejemplos de porciones biológicamente activas son los miembros de la familia de la avidina, un factor de crecimiento útil para estimular a los efectores inmunológicos dirigidos a tumores (por ejemplo, G-CSF, GM-CSF), una porción farmacológicamente activa, tal como, por ejemplo, una toxina, un superantígeno, una citoquina o cualquier otra proteína útil para potenciar el efecto terapéutico anticáncer, fármacos anticáncer y radioisótopos.

Para más información con respecto a la preparación de los derivados recombinantes y conjugados, se remite al documento WO 03/072608.

Según la presente invención, los derivados recombinantes o conjugados del anticuerpo monoclonal también se denominan "derivados".

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo, sus fragmentos y derivados pueden estar biotinilados.

El anticuerpo según la presente invención, sus fragmentos y derivados también pueden contener, de modo

ventajoso, otros marcadores y agentes de diagnóstico.

La presente invención también incluye el ADN que codifica el anticuerpo monoclonal o sus fragmentos, tal como se definió anteriormente. La invención también comprende un vector que contiene dicho ADN, y una célula hospedantes que contiene dicho vector.

Los vectores y las células hospedantes se encuentran dentro de la esfera del conocimiento habitual relacionado con este campo.

La presente invención también comprende la proteína codificada por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID 1 y SEQ ID 2 o sus fragmentos, y el ADN que la codifica.

El proceso para preparar un anticuerpo según la presente invención consiste en las siguientes etapas:

a) inmunización de un animal, preferiblemente un ratón, con el fragmento $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana;

b) fusión de las células somáticas del bazo de dicho animal con células de mieloma que no producen inmunoglobulinas;

c) selección del anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo monoclonal ST2485 se produce a partir de la línea celular de hibridoma cST2485, identificada anteriormente.

Según la presente invención, el anticuerpo, o sus fragmentos o sus derivados, opcionalmente biotinilados, se emplean para la preparación de un producto farmacéutico útil para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por la expresión de tenascina. En particular, dichas enfermedades son tumores, y más en concreto incluyen gliomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, fibrosarcoma y carcinoma de células escamosas.

En un aspecto preferido, el producto farmacéutico mencionado anteriormente se emplea en la terapia perioperatoria de dos etapas de tumores sólidos, descrita en el documento WO 03/07268. En este tipo de terapia, se administra el anticuerpo biotinilado, seguido de avidina, construyendo así el "receptor artificial" para el verdadero agente anticáncer posterior. En este caso, el agente anticáncer será transportado por la biotina, que estará contenida en un compuesto químico adecuado para formar un complejo con el agente anticáncer y denominado en lo sucesivo como el compuesto de biotina, y se administrará de modo sistémico en la fase posoperatoria. De hecho, la biotina se localizará solo en los lugares en los que la avidina esté presente y, en este caso, se puede asegurar que la avidina estará presente en el área que se interesa tratar, ya que ha sido introducida por el cirujano unas pocas horas antes (por ejemplo, de 4 a 72 horas) durante la operación. Esto constituye una ventaja porque reduce drásticamente el tiempo que transcurre entre la retirada del tumor primario y la terapia adyuvante.

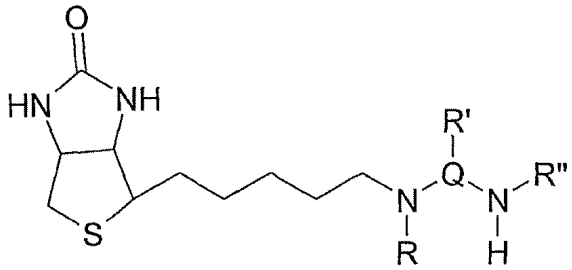
Con respecto a los aspectos industriales de la presente invención, el anticuerpo descrito en la presente puede formularse de modo adecuado en composiciones terapéuticas o kits terapéuticos o de diagnóstico, según la práctica normal en el campo farmacéutico.

Las composiciones y los kits farmacéuticos son siempre del tipo que se emplea habitualmente en este campo y pueden ser preparados por los expertos en la técnica incluso basándose solo en el conocimiento habitual. Se proporcionan ejemplos de composiciones farmacéuticas en las referencias citadas en la presente invención. Esto también es verdad para los kits. Se prefieren en particular los kits para la radioinmunoterapia de tumores, tal como se describen en los estudios mencionados anteriormente de Paganelli *et al.*, y en los documentos EP 0 496 074, WO 02/066075, WO 03/072608, y WO 03/075960. Un uso particular del kit de radioinmunoterapia puede ponerse en práctica con el dispositivo descrito en el documento WO 03/069632.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo, o sus derivados o sus fragmentos, opcionalmente biotinilados, en mezclas con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, se incluyen en el alcance de la presente invención.

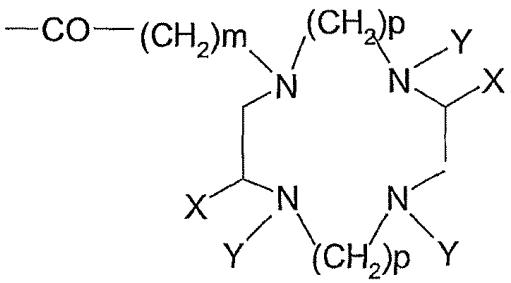
En una realización particular de la presente invención, se suministran kits para la radioinmunoterapia sistémica, en particular la radioinmunoterapia de prelocalización en tres etapas, que contienen 5 viales: el vial 1 que contiene un anticuerpo o sus fragmentos o derivados recombinantes o sus conjugados o análogos, opcionalmente biotinilados; el vial 2 que contiene avidina; elvial 3 que contiene estreptavidina; el vial 4 que contiene albúmina humana biotinilada; y el vial 5 que contiene biotina DOTA.

En otra realización de la presente invención, los kits son para la radioinmunoterapia locorregional y contienen 3 viales que son iguales que los viales 1, 2 y 5 del kit sistémico. En una realización particularmente preferida, en el vial que contiene biotina DOTA, dicha biotina DOTA es el compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que Q es un grupo $-(CH_2)_n-$, en el que n es un número entero de 4 a 12, en cuyo caso R' no está presente, o Q se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_a-CH(R')_b-(CH_2)_b-$, en el que a y b son independientemente números enteros de 0 a n, R' es como se define a continuación, o Q es ciclohexilo, fenilo, en cuyo caso R' es un sustituyente del anillo de ciclohexilo o fenilo; R es hidrógeno o -A, en el que -A es un macrociclo de fórmula (II):



(II)

en la que los diversos Y, que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, $-(CH_2)_m-COOH$, en el que m es un número entero de 1 a 3, X es hidrógeno, o el grupo $-CH_2-U$, en el que U se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo y p-aminofenilo, o X es el grupo $-(CHW)_o-Z$, en el que o es un número entero de 1 a 5, W es hidrógeno, metilo o etilo, Z es un grupo heterocíclico de 5 o 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de O, N-R_1, en el que R_1 es hidrógeno o alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, y S; o

Z se selecciona del grupo que consiste en $-NH_2$ -NH-C(=NH)-NH_2, o -S-$R_2$2, en el que R_2 es alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado;

p es el número 2 o 3;

R' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, $-(CH_2)_q-T$, en el que T se selecciona del grupo que consiste en $-S-CH_3$, -OH, -COOH, y q es el número 1 o 2;

R" tiene los mismos significados que R', con las siguientes condiciones: si R es -A, R" es hidrógeno; si R es hidrógeno, R" es -A, o R y R" son, respectivamente, $-(CH_2)_r-A$ (para R), en el que r es un número entero de 4 a 12, y -A (para R'), siendo Q un grupo $-(CH_2)_n$, en el que n es un número entero de 4 a 12.

Estos compuestos se describen en el documento WO 02/066075.

En una realización particularmente preferida, en el vial que contiene avidina, esta última es un dímero de avidina en el que las dos moléculas de avidina están unidas a través de grupos $-NH_2$ por medio de suberato, o es un dímero de avidina en el que dos moléculas de avidina están unidas a través de grupos -COOH por medio de polietilenglicol con un peso molecular de 3.400, tal como se describe en el documento WO 03/075960.

En los kits según la invención, el anticuerpo, sus fragmentos proteolíticos, sus derivados, opcionalmente biotinilados, pueden estar en combinación con otros anticuerpos anti-tenascina, preferiblemente dirigidos a la región similar a EGF de la proteína, o en combinación con otros anticuerpos específicos de tumor.

Todos los aspectos de esta invención, además de ser aplicables a la terapia de tumores que expresan tenascina, también son aplicables al diagnóstico de tumores y, en particular, a procedimientos de inmunolocalización de tumores, por ejemplo, formación de imágenes. Otro objeto de la presente invención es un recipiente, preferiblemente en forma de un vial adecuado para la inyección, que contiene un anticuerpo o sus fragmentos proteolíticos o sus derivados, opcionalmente biotinilados y/o radiomarcados.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo o sus fragmentos, derivados recombinantes o análogos, se emplean en combinación con un segundo anticuerpo específico de tenascina, en un ensayo ELISA de tipo "sandwich" *in vitro*,, en condiciones en las que dicho segundo anticuerpo se une a un segundo epitopo antigénico de la tenascina, para determinar los niveles de tenascina en circulación, y en particular las isoformas que contienen la región $A_{(1-4)}$-D.

El siguiente ejemplo ilustra más a fondo la invención.

Ejemplo 1

Con el fin de generar un nuevo hibridoma con especificidad para BC-2 pero que no produce una cadena ligera no funcional, se inmunizaron ratones Balb/c con el fragmento $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana, que contiene el epitopo reconocido por BC-2 (Siri, A., *et al.*, Nucl. Acid Res., 19(3):525-531, 1991*;* Balza, E., *et al.*, FEBS, 332:39-43, 1993). La representación esquemática de la tenascina C humana y la estrategia adoptada para generar el anticuerpo similar a BC-2 se ilustran en la figura 1. Células de bazo de ratones inmunizados con el fragmento Tn ($A_{(1-4)}$-D) se fusionaron con células de mieloma que no producen inmunoglobulinas Sp2/0-Ag14 según métodos convencionales (Cianfriglia, M., *et al.*, Methods Enzymol., 121:193-210, 1986), y la población de hibridoma obtenida se sometió a una selección por medio de un ensayo ELISA con tenascina purificada a partir de células de melanoma humano SK-Mel 28 (ICLC HTL99010). Los hibridomas que segregan anticuerpos anti-tenascina se clonaron dos veces mediante diluciones limitantes en medio de crecimiento que contenía FCS y dos veces en medio sin proteínas de origen animal (Animal Derived Component Free Medium HyClone, HyQR Perbio).

Se logró la producción del material de referencia ST2485 cultivando las células de hibridoma cST2485 en un biorreactor de dos litros; dos subclonaciones de dilución limitante sucesivas del banco de células de posproducción ("Post Production Cell Bank", PPCB) de cST2485 condujeron a la selección del subclón cST2485/A3e/A12f, empleado para la producción del banco de células maestras ("Master Cell Bank", MCB) y el banco de células de trabajo ("Working Cell Bank", WCB).

ST2485 es una inmunoglobulina de ratón de isotipo IgG1/k.

La figura 2 muestra el análisis de SDS-PAGE (a, b) y transferencia Western (c, d) del anticuerpo ST2485 en condiciones reductoras y no reductoras. En condiciones reductoras (b, d), se observa una banda doble al nivel de la cadena ligera del anticuerpo; el análisis de la transferencia Western demuestra que las dos bandas son inmunorreactivas como cadenas ligeras de inmunoglobulina. El análisis cromatográfico de hidroxiapatito del anticuerpo ST2485, mostrado en la figura 3, confirma una heterogeneidad suave del anticuerpo por medio del pico ligeramente asimétrico. En el mismo análisis, por otra parte, el anticuerpo BC-2 presenta un perfil claramente heterogéneo, en el que pueden distinguirse tres picos, de los cuales solo el pico 1 se corresponde con el anticuerpo homogéneo totalmente funcional.

Para definir la naturaleza de la heterogeneidad del anticuerpo ST 2485, una muestra de este se sometió a una digestión de los restos N-glicósido con la enzima PNGasa F (péptido-N-glicosidasa de *Flavobacterium*). La digestión enzimática se realizó empleando el kit de desglicosilación Prozyme (n.º de catálogo GE51001), en las condiciones indicadas por el fabricante: aproximadamente 8 μg de ST2485 y 5 mU de enzima se hicieron reaccionar durante la noche a 37 °C en 10 μl de mezcla de reacción. El anticuerpo ST2485, digerido y no digerido, se ensayó en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

La digestión provocó la desaparición de la banda de cadena ligera de alto peso molecular, según se demuestra mediante el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras ilustrado en la figura 4. Este descubrimiento demuestra que las dos bandas de cadena ligera del anticuerpo ST2485 se corresponden con sus variantes glicosilados (alto peso molecular) y no glicosilados (bajo peso molecular). La existencia de un sitio de N-glicosilación potencial también fue confirmada por los datos de la secuencia de ADNc de inmunoglobulina (figura 17).

La región variable de la cadena ligera kappa fue amplificada por el ADNc circularizado empleando una pareja de cebadores (5' GGGAAGATGGATACAGTTGGT-G, 5' CAAGAGCTTCAACAGGAATGAG) que reconocen la región constante del anticuerpo, según se describe en M. Sassano *et al.*, Nucl. Ac. Res., (1994) 22, 1768-1769.

La unión de ST2485 a la región $A_{(1-4)}$-D de la tenascina es específica, según se demuestra mediante el análisis de la transferencia Western presentado en la figura 5. El anticuerpo se une a la tenascina humana y al fragmento $A_{(1-4)}$-D, pero no al fragmento similar a EGF de la misma proteína, que contiene el epitopo reconocido por el anticuerpo BC-4.

El anticuerpo ST2485 se une a la tenascina humana en un epitopo diferenciado o en un epitopo parcialmente compartido con BC-2, según se demuestra mediante un ensayo ELISA competitivo entre los dos anticuerpos, ilustrado en la figura 6. El anticuerpo biotinilado BC-2, a una concentración establecida en experimentos preliminares, se dispensa con BC-2 no biotinilado (curva 1) o ST2485 (curva 2) en concentraciones crecientes en placas sensibilizadas con el antígeno de tenascina C (a), o el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D (b). La unión del anticuerpo biotinilado se mide después de la adición de HRP-estreptavidina y el sustrato cromogénico relacionado TMB. El anticuerpo ST2485 provoca una inhibición del 40% de la unión de BC-2 a la tenascina C o al fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D.

Se evaluó la inmunorreactividad de ST2485 en comparación con BC-2 mediante un ensayo ELISA con la tenascina

C y con el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D, tal como se muestra en la figura 7. Los anticuerpos ST2485 y BC-2 y las inmunoglobulinas de ratón normales (nMIgG) se dispensaron a concentraciones crecientes en placas sensibilizadas con tenascina C (a) o con el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D (b); la adición del anticuerpo antirratón secundario marcado con fosfatasa alcalina y el sustrato cromogénico relacionado (pNPP) permite determinar la curva de dosis-respuesta de los anticuerpos. La cantidad de ST2485 necesaria para obtener DO 1,0 es aproximadamente 13 veces menor que la cantidad de BC-2 con la tenascina completa (a), y aproximadamente 10 veces menor que la cantidad de BC-2 con el fragmento Tn (A1-4-D)(b).

Se evaluó la afinidad del anticuerpo ST2485 con la tenascina C y con el fragmento Tn (A_{1-4}-D) mediante un análisis BIAcore. Con la tenascina C, la KD_1 de ST2485 es de 9,77 x 10^{-10} M (ka_1 = 6,02 x 10^5; kd_1 = 5,88 x 10^{-4}), mientras que la KD_1 de BC-2 es de 2,54 x 10^{-7} M (ka_1 = 9,85 x 10^3; kd_1 = 2,5 x 10^{-3}). Con el fragmento Tn (A_{1-4}-D), la KD_1 de ST2485 es de 9,72 x 10^{-10} M (ka_1 = 3,28 x 10^5; kd_1 = 3,19 x 10^{-4}) mientras que la KD_1 de BC-2 es de 7,39 x 10^{-8} M (ka_1 = 2,68 x 10^4; kd_1 = 1,93 x 10^{-3}).

El mantenimiento de la inmunorreactividad después de la biotinilación constituye un requisito fundamental para el anticuerpo empleado en la prelocalización y, por tanto, se evaluó el comportamiento de ST2485 biotinilado (8,3 biotinas/molécula) mediante ensayos de ELISA y BIAcore, en comparación con BC-2 biotinilado (7,6 biotinas/molécula). Con respecto a la figura 8, los anticuerpos ST2485 y BC-2, biotinilados y no biotinilados, y las inmunoglobulinas de ratón normales (nMIgG) se dispensaron a concentraciones crecientes en placas sensibilizadas con tenascina C (a) o con el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D (b); la adición del anticuerpo antirratón secundario marcado con fosfatasa alcalina y el sustrato cromogénico relacionado (pNPP) permite determinar la curva de dosis-respuesta de cada anticuerpo biotinilado, comparado con el anticuerpo no biotinilado (inmunorreactividad residual). La inmunorreactividad residual de ST2485 y BC-2 biotinilados con la tenascina C es igual a 76% y 88%, respectivamente. Con el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D, la inmunorreactividad residual para ST2485 y BC-2 es del 73% y 83%, respectivamente.

El análisis BIAcore de los anticuerpos biotinilados con la tenascina completa muestra una afinidad KD_1 = 2,88 x 10^{-9} M para ST2485 biotinilado (ka_1 = 2,8 x 10^5; kd_1 = 8,07 x 10^{-4}) y una afinidad KD_1 = 3,71 x 10^{-7} M para BC-2 biotinilado (ka_1 = 6,0 x 10^3; kd_1 = 2,23 x 10^{-3}). Así, ST2485 biotinilado mantiene unas buenas características de inmunorreactividad y afinidad, conservando una afinidad por la tenascina aproximadamente 100 veces mayor que la del BC-2 biotinilado.

Estudios inmunohistoquímicos sobre diversos tumores humanos (mama, pulmón, estómago, colon) han demostrado la localización de ST2485 al nivel de la matriz extracelular, similar a la indicada para BC-2 (Natali, PG, *et al.*, Int. J. Cancer, 47:811-816, 1991). Estos estudios también han demostrado la capacidad de ST2485 de producir una reacción cruzada con la tenascina murina, incluyendo la expresada en tejidos de ratón normales, como puede observarse en la figura 9. Se incubaron secciones de tumor LMM3 (carcinoma mamario murino) e intestino murino normal fijado en formol con 10 μg/ml de ST2485 o de anticuerpo IgG1 murino normal (control). Después de una incubación con el anticuerpo antirratón secundario biotinilado y el complejo de avidina-biotina-peroxidasa (kit Vectastain Elite ABC) se detectó la unión a la tenascina mediante la adición del sustrato colorimétrico DAB (Vector). El contraste se realizó con hematoxilina de Mayer. Las secciones de LMM3 y de intestino murino fueron positivas con ST2485, pero no con el anticuerpo control. No fue posible realizar estos estudios en comparación con BC-2, puesto que este anticuerpo no reconoce las secciones de tejidos fijadas incrustadas en parafina. La capacidad de ST2485 de reconocer la tenascina murina, incluyendo la expresada por tejidos normales, potencia la importancia de los resultados obtenidos en los estudios de biodistribución de anticuerpos en el modelo murino descrito a continuación.

Con el fin de evaluar la capacidad del anticuerpo para localizarse en la masa tumoral se realizaron estudios de biodistribución de ST2485 y BC-2 marcados con ^{125}I y biotinilados. Estos estudios se realizaron en ratones atímicos ("nude") a los que se les había implantado tumores humanos que expresan tenascina, según el protocolo representado esquemáticamente en la figura 10.

Los animales recibieron una inyección subcutánea de 4 x 10^6 células HT-29 de carcinoma de colon humano en 0,1 ml de disolución salina estéril. Después de 15 días, cuando el tumor hubo alcanzado una masa de aproximadamente 200 mg, grupos de cinco animales recibieron administraciones intravenosas de ^{125}I-BC2, ^{125}I-ST2485, o ^{125}I-inmunoglobulinas de ratón normal (nMIg), todos biotinilados (7-9 biotinas/mol) y en cinco dosis diferentes: 0,2-0,5-1-2-5 μg/ratón en 100 μl de PBS estéril. Cinco días después de la administración de los anticuerpos, los animales se sacrificaron y se tomaron muestras de sangre, bazo, riñón, hígado y tumor para determinar la radiactividad presente. Veinticuatro horas antes del sacrificio, los animales recibieron una administración intravenosa de avidina en 100 μl de PBS estéril, a unas dosis 100 veces mayores que la del anticuerpo (persecución).

Los resultados, presentados en las figuras 11 y 11a, demuestran que ambos BC-2 y ST2485 se localizan específicamente en el tumor, independientemente de la dosis (las cantidades de anticuerpo se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido: %ID/gr). Además, ST2485 muestra una mayor localización en el tumor comparado con BC-2 en todas las dosis ensayadas, y siempre mantiene una proporción mayor de tumor a no tumor (figuras 12 y 12a). En particular, a la dosis de 1 μg/ratón, la acumulación de ST2485 en el tumor es igual a 16% de la dosis inyectada, mientras que la acumulación de BC-2 no es mayor que 5% a cualquiera de las dosis

ensayadas. A la dosis de of 1 μg/ratón, la proporción tumor:sangre para ST2485 es mayor que 20 (dosis óptima), mientras que para el anticuerpo BC-2, esta proporción nunca es mayor que 6 a cualquiera de las dosis ensayadas. En los otros órganos, las proporciones de tumor a no tumor para ST2485 a la dosis de 1 μg/ratón son de 9, 26, y 43 con relación al bazo, riñón e hígado, respectivamente. Por otra parte, para BC-2, estas proporciones son siempre menores que 7 a todas las dosis ensayadas. Las proporciones de tumor a no tumor se muestran en las figuras 12 y 12a.

Con el fin de evaluar la posibilidad del uso combinado de los anticuerpos anti-tenascina ST2485 y ST2146 en los métodos PAGRIT® y IART, estando ST2416 dirigido a un epitopo localizado en la región similar a EGF de la proteína (De Santis, R., *et al.*, Br. J. Cancer, 88:996-1003, 2003*,* documento WO 03/072608), se realizaron experimentos de aditividad *in vitro* e *in vivo* con los dos anticuerpos. La figura 13, en dos ensayos de ELISA realizados con placas sensibilizadas con tenascina C, muestra la ausencia de interferencia de epitopo entre los anticuerpos ST2485 y ST2146 (13a) y la naturaleza aditiva de su unión al antígeno (13b). Para la evaluación de la interferencia (a) se dispensó un anticuerpo biotinilado ST2485, a concentraciones crecientes, a microplacas sensibilizadas con tenascina C en ausencia (1) y en presencia (2) de ST2146 a una concentración saturante: las curvas superpuestas 1 y 2 indican la ausencia de interferencia de epitopo entre los dos anticuerpos, ya que la unión de ST2485 biotinilado a la tenascina no se vio afectada por la presencia de ST2146 (y viceversa; los datos no se muestran). La curva 3 muestra la señal obtenida cuando se siembra ST2485 biotinilado en presencia de ST2485 no biotinilado saturante (control).

La figura 13b muestra el ensayo de aditividad, en el que se dispensaron los anticuerpos biotinilados ST2485 y ST2146 en dosis saturantes, por separado o juntos, a microplacas sensibilizadas con tenascina C: la mezcla de los dos anticuerpos produce una señal igual a la suma de las señales, demostrando así que la unión de los dos anticuerpos es aditiva.

También se ensayó la aditividad *in vitro* de los dos anticuerpos empleando un análisis BIACore, tal como se muestra en las figuras 14 y 14a. La tenascina fue inmovilizada sobre el chip (chip detector CM5, Biosense) según el método descrito (De Santis R., *et al.*, Br. J. Cancer, 88:996-1003, 2003*).* Se administraron dos inyecciones consecutivas del primer anticuerpo (ST2485 en a, ST2146 en c) a concentraciones saturantes (10 μM), seguidas de la inyección del segundo anticuerpo anti-tenascina (ST2146 en a; ST2485 en c). Los sensogramas a) y c) muestran que los dos anticuerpos son capaces de unirse a los respectivos epitopos de una manera aditiva, tal como se muestra por el aumento en la señal de resonancia producida por cada anticuerpo individual. Los sensogramas b) y d) representan las inyecciones de ST2485 y ST2146, respectivamente, cada una seguida de los respectivos anticuerpos de control de isotipo, mIgG2b y mIgG1.

El estudio de aditividad de los dos anticuerpos ST2485 y ST2146 también se realizó *in vivo* en el modelo animal previamente descrito. El esquema del estudio se ilustra en la figura 15, mientras que los resultados obtenidos se presentan en la figura 16, expresados en ng de anticuerpo por gramo de tumor. Los datos confirman la aditividad de los dos anticuerpos también en el modelo animal. La mezcla de los dos anticuerpos marcados, de hecho, presenta una acumulación en el tumor que asciende al 93% del valor teórico (suma matemática de los dos anticuerpos marcados individuales). Se trataron grupos de animales control con mezclas del anticuerpo radiomarcado y un segundo anticuerpo "frío" para evitar cualquier interferencia.

Se amplificó la región variable de la cadena ligera kappa comenzando a partir del ADNc circularizado empleando una pareja de cebadores (5' GGGAAGATGG-ATACAGTTGGTG 3', 5' CAAGAGCTTCAACAGGAATGAG 3') que reconocen la región constante de la cadena ligera del anticuerpo, según se describe en M. Sassano, *et al.*, Nucl. Ac. Res., (1994) 22, 1768-1769*.*

Se amplificó la región variable de la cadena pesada gamma comenzando a partir del ADNc circularizado empleando una pareja de cebadores (5' ATGGAGTTAG-TTTGGGCAGCAG 3', 5' GCACAACCACCATACTGAGAAG 3') que reconocen la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, según se describe en M. Sassano, *et al.,* Nucl. Ac. Res., (1994) 22, 1768-1769*.*

La figura 17 muestra la secuencia SEQ ID 1 de la región variable de la cadena ligera (VL) de ST2485.

La figura 18 muestra la secuencia SEQ ID 2 de la región variable de la cadena pesada (VH) de ST2485.

La caracterización comparativa de ST2485 comparado con BC-2 demuestra que el anticuerpo ST2485 posee las siguientes características:

- reconoce un epitopo dentro de la región $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana, cercano o parcialmente solapante con el de BC-2;

- es un anticuerpo homogéneo con respecto a la composición de la cadena ligera y pesada, porque la heterogeneidad observada es debida a variantes de glicosilación de la cadena ligera;

- es más inmunorreactivo que BC-2;

- tiene mayor afinidad por el antígeno que BC-2;

- es comparable a BC-2 con respecto al mantenimiento de la inmunorreactividad después de la biotinilación;

- es mejor que BC-2 con respecto a la localización tumoral en el modelo animal;

- se une de una manera aditiva con el anticuerpo monoclonal anti-tenascina ST2146 a la tenascina C, tanto *in vitro* como *in vivo* en el modelo animal.

Referencias bibliográficas

Balza E., Siri A., Ponassi M., Caocci F., Linnala A., Virtanen I., Zardi L., Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin, FEBS, 332:39-43, 1993.

Bourdon M.A., Wikstrand C.J., Furthmayr H., Matthews T.J., Bigner D.D., Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody, Cancer Res., 43(6):2796-2805, 1983.

Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G., Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity, British Journal of Cancer, 78(2):189-197, 1998.

Chiquet-Ehrismann R., Mackie E. J., Pearson C.A., Sakakura T., Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis, Cell, 47(1):131-139, 1986.

Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D., Massone A., Lafata M., Presentini L. y Antoni G., Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of monoclonal antibodies obtained, Methods Enzymol., 121:193210, 1986.

Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G., Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients, Eur. J. Nucl. Med., 26(2):110-120, 1999.

De Santis R., Anastasi A.M., D'Alessio V., Pelliccia A., Albertoni C., Rosi A., Leoni B., Lindsdedt R., Petronzelli F., Dani M., Verdoliva A., Ippolito A., Campanile A., Manfredi V., Esposito A., Cassani G., Chinol M., Paganelli G. y Carminati P., Novel antitenascin antibody with increased localisation for Pretargeted Antibody-Guided RadioimmunoTherapy (PAGRIT), Br. J. Cancer, 88, 996-1003, 2003.

Di Massimo A.M., Di Loreto M., Pacilli A., Raucci G., D'Alatri L., Mele A., Bolognesi A., Polito L., Stirpe F. y De Santis R., Immunoconjugates made of an anti-EGF-receptor Monoclonal Antibody and Type 1 RIPs from *Saponaria ocymoides* or *Vaccaria pyramidata*, Br. J. Cancer, 75(6):822-828, 1997.

Ferrer C., Anastasi A.M., Di Massimo A.M., Bullo A., Di Loreto M., Raucci G., Pacilli A., Rotondaro L., Mauro S., Mele A. y De Santis R., Expression and characterization of a mouse/human chimeric antibody specific for EGF receptor, J. Biotechnol., 52: 51-60, 1996.

Grana C., Chinol M., Robertson C., Mazzetta C., Bartolomei M., De Cicco C., Fiorenza M., Gatti M., Caliceti P. y Paganelli G., Pretargeted adjiuvant radioimmunotherapy with Yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: a pilot study, Br. J. Cancer, 86: 207-212, 2002.

Natali P.G., Nicotra M.R., Bigotti A., Botti C., Castellani P., Risso A.M. y Zardi L., Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues, Int. J. Cancer, 47: 811-816, 1991.

Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M., Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results, Cancer Biother. & Radiopharm., 16(3):227-235, 2001.

Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurrida S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U., Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin, Eur. J. Nucl. Med., 26(4):348-357, 1999.

Paganelli G., Magnani P., Zito F., Lucignani G., Sudati F., Truci G., Motti E., Terreni M., Pollo B., Giovanelli M., Pretargeted immunodetection in glioma patients: tumor localization and single-photon emission tomography imaging of [99mTc]PnAO-biotin, Eur. J. Nucl. Med., 21(4):314-21, 1994.

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo A.M., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. y De Santis R., Production and *in vitro* characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*, Anticancer Research, 17(6A):4073-4074, 1997.

Penichet, M.L., Kang Y.S., Pardridge W.M., Morrison S.L., y Shin S.U., An antibody-avidin fusion protein specific for the transferrin receptor serves as a delivery vehicle for effective brain targeting: initial applications in anti-HIV antisense drug delivery to the brain 1, J. Immunol., 163: 4421-4426, 1999.

Ramos D.M., Chen B., Regezi J., Zardi L, Pytela R., Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma, Int. J. Cancer, 75:680-687, 1998.

Riva P., Arista A., Sturiale C., Moscatelli G., Tison V., Mariani M., Seccamani E., Lazzari S., Fagioli L., Franceschi G., *et al.*, Treatment of intracranial human glioblastoma by direct administration of 131I-labelled anti-tenascin monoclonal antibody BC-2, Int. J. Cancer, 51(1):7-13, 1992.

Riva P., Franceschi G., Arista A., Frattarelli M., Riva N., Cremonini A.M., Giuliani G., Casi M., Local application of radiolabeled monoclonal antibodies in the treatment of high grade malignant glioma: a six-year clinical experience, Cancer, 80 (12 supl.):2733-2742, 1997.

Riva P., Franceschi G., Frattarelli M., Riva N., Guiducci G., Cremonini A.M., Giuliani G., Casi M., Gentile R., Jekunen A.A., Kairemo K.J., 131I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma - phase I and II study, Acta Oncol., 38(3):351-359, 1999.

Siri A., Carnemolla B., Saginati M., Leprini A., Casari G., Baralle F. y Zardi L., Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitope recognized by two monoclonal antibodies, Nucl. Acid Res., 19(3):525-531, 1991.

Listado de secuencias

<110> TECNOGEN S.c.p.A.
DE SANTIS, Rita
PELLICCIA, Angela
PALOMBO, Giovanna
CARMINATI, Paolo

<120> ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-TENASCINA HUMANA

<130> PCT-9110

<140>
<141>

<150> RM2004A000105
<151> 27-02-2004

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 393
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(393)

<400> 1

```
atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gct tca   48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
  1               5                  10                  15

gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc tcc cag tct cca gca atc   96
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
             20                  25                  30

ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca atg act tgc agg gcc aac   144
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Asn
         35                  40                  45

tca agt gta cgt ttc atg cac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc   192
Ser Ser Val Arg Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
     50                  55                  60

ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct   240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65                  70                  75                  80

gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct gtc aca atc   288
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Val Thr Ile
                 85                  90                  95

agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg   336
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
            100                 105                 110

agt agt aat tca ccc agg acg ttc ggt gga ggc acc aag gtg gaa atc   384
Ser Ser Asn Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
        115                 120                 125

aga cgg gct                                                      393
Arg Arg Ala
```

<210> 2
<211> 414
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(414)

<400> 2

```
atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt   48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
  1               5                  10                  15

gtc cac tct gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gag ctg gtg aag   96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
             20                  25                  30

cct gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc   144
Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
         35                  40                  45

act ggc tac acc atg aac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aac ctt   192
Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
     50                  55                  60

gaa tgg att gga ctt att aat cct cac aat ggt ggt act acc tac aac   240
Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
 65                  70                  75                  80

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc aac   288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
                 85                  90                  95

aca gcc tac atg gag ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc   336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

tat tac tgt aca aga ccc ggg ggt tac tac tgg ttc ttc gat gtc tgg   384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Gly Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
        115                 120                 125

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                           414
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 3
<211> 131
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 3

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
  1               5                  10                  15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
             20                  25                  30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Asn
         35                  40                  45

Ser Ser Val Arg Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
     50                  55                  60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65                  70                  75                  80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Val Thr Ile
                 85                  90                  95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
            100                 105                 110

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

Arg Arg Ala
    130
```

<210> 4
<211> 138

<212> PRT
<213> *Mus musculus*

```
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
  1               5                  10                  15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
             20                  25                  30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
         35                  40                  45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
     50                  55                  60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
 65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
                 85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Gly Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
        115                 120                 125

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<400> 4

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 5
gggaagatgg atacagttgg tg 22

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 6
caagagcttc aacaggaatg ag 22

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 7
atggagttag tttgggcagc ag 22

<210> 8
<211> 22

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 8
gcacaaccac catactgaga ag 22

REIVINDICACIONES

1.- Un anticuerpo monoclonal anti-tenascina humana, cuyas secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada son SEQ ID 3 y SEQ ID 4, respectivamente, y sus conjugados, siendo capaces dichos conjugados de unirse a un epitopo antigénico dentro de la región $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana.

2.- El anticuerpo biotinilado según la reivindicación 1.

3.- El ADN que codifica el anticuerpo según la reivindicación 1.

4.- Un vector que contiene el ADN según la reivindicación 3.

5.- Una célula hospedante que contiene el vector según la reivindicación 4.

6.- Una proteína codificada por las secuencias de nucleótidos SEQ ID 1 y SEQ ID 2.

7.- El ADN que codifica la proteína de la reivindicación 6.

8.- Un hibridoma que produce el anticuerpo según la reivindicación 1, depositado en Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rossana Benzi 10, Génova, Italia, el 12 de noviembre de 2003 según las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de depósito PD03003.

9.- Un proceso para la preparación del anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende

a) la inmunización de un animal no humano con el fragmento $A_{(1-4)}$-D de la tenascina humana;

b) la fusión de las células somáticas del bazo de dicho animal con células de mieloma que no producen inmunoglobulinas;

c) la selección del anticuerpo monoclonal.

10.- El uso del anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados, para la preparación de un producto farmacéutico útil para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad **caracterizada por** la expresión de tenascina.

11.- El uso según la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad es un tumor.

12.- El uso según la reivindicación 11, en el que dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en gliomas, cáncer de mama, carcinoma de pulmón, fibrosarcoma y carcinoma de células escamosas.

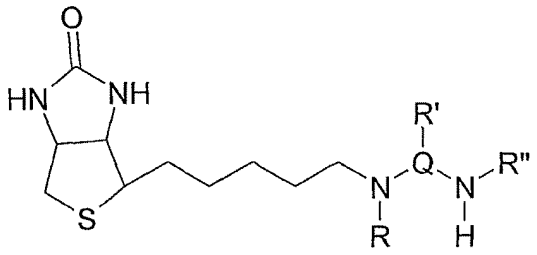
13.- El uso del anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados, para la preparación de un producto farmacéutico útil para la terapia perioperatoria en dos etapas de tumores sólidos.

14.- Composiciones farmacéuticas o de diagnóstico que contienen un anticuerpo, o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados, en mezclas con al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15.- Un kit para la radioinmunoterapia sistémica, en particular la radioinmunoterapia de prelocalización en tres etapas, que consiste en 5 viales: un vial 1 que contiene un anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados; un vial 2 que contiene avidina; un vial 3 que contiene estreptavidina; un vial 4 que contiene albúmina humana biotinilada; y un vial 5 que contiene biotina DOTA.

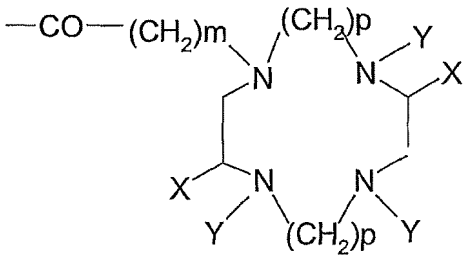
16.- Un kit para la radioinmunoterapia locorregional que consiste en 3 viales: un vial 1 que contiene un anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados; un vial 2 que contiene avidina; y un vial 3 que contiene biotina DOTA.

17.- Un kit según la reivindicación 15 o 16, en el que dicha biotina DOTA en el vial 5 o en el vial 3, respectivamente, es el compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que Q es un grupo $-(CH_2)_n-$, en el que n es un número entero de 4 a 12, en cuyo caso R' no está presente, o Q se selecciona del grupo que consiste en $-(CH_2)_a-CH(R')_b-(CH_2)_b-$, en el que a y b son independientemente números enteros de 0 a n, R' es como se define a continuación, o Q es ciclohexilo, fenilo, en cuyo caso R' es un sustituyente del anillo de ciclohexilo o fenilo;



(II)

R es hidrógeno o -A, en el que -A es un macrociclo de fórmula (II):

en la que los diversos Y, que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, $-(CH_2)_m-COOH$, en el que m es un número entero de 1 a 3, X es hidrógeno, o el grupo $-CH_2-U$, en el que U se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo y p-aminofenilo, o X es el grupo $-(CHW)_o-Z$, en el que o es un número entero de 1 a 5, W es hidrógeno, metilo o etilo, Z es un grupo heterocíclico de 5 o 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de O, N-R_1, en el que R_1 es hidrógeno o alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, y S; o Z se selecciona del grupo que consiste en $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, o $-S-R_2$, en el que R_2 es alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado;

p es el número 2 o 3;

R' se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, $-(CH_2)_q-T$, en el que T se selecciona del grupo que consiste en $-S-CH_3$, -OH, -COOH, y q es el número 1 o 2;

R" tiene los mismos significados que R', con las siguientes condiciones: si R es -A, R" es hidrógeno; si R es hidrógeno, R" es -A, o R y R" son, respectivamente, $-(CH_2)_r-A$ (para R), en el que r es un número entero de 4 a 12, y -A (para R'), siendo Q un grupo $-(CH_2)_n$, en el que n es un número entero de 4 a 12.

18.- Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que el vial 2 contiene un dímero de avidina en el que dos moléculas de avidina están unidas a través de los grupos $-NH_2$ por medio de suberato.

19.- Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que dicho vial 2 contiene un dímero de avidina en el que dos moléculas de avidina están unidas a través de los grupos -COOH por medio de polietilenglicol con un peso molecular de 3.400.

20.- Un kit según la reivindicación 16 o 17, en el que el anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados, se combinan con otros anticuerpos anti-tenascina, preferiblemente dirigidos a la región similar a EGF de la proteína.

21.- Un kit según la reivindicación 16 o 17, en el que el anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1,

opcionalmente biotinilados, se combinan con otros anticuerpos específicos de tumor.

22.- El uso del anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados, en la preparación de composiciones útiles en el procedimiento de inmunolocalización de tumores.

23.- Un recipiente, preferiblemente en forma de un vial adecuado para la inyección, que contiene un anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados y/o radiomarcados.

24.- Un anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, opcionalmente biotinilados, para su uso como agente de inmunolocalización para la formación de imágenes de un tumor.

25.- Un anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 24, en los que el anticuerpo o los conjugados están radiomarcados.

26.- Una combinación que contiene el anticuerpo o sus conjugados según la reivindicación 1, y un segundo anticuerpo específico de tenascina.

27.- El uso de la combinación según la reivindicación 27 en un ensayo ELISA de tipo "sandwich" *in vitro*, en condiciones en las que dicho segundo anticuerpo se une a un segundo epitopo antigénico, para determinar los niveles de tenascina en circulación, y en particular las isoformas que contienen la región $A_{(1-4)}$-D.

Figura 1

Representación esquemática de la tenascina C humana y de la estrategia seguida para la generación de anticuerpos similares a BC2

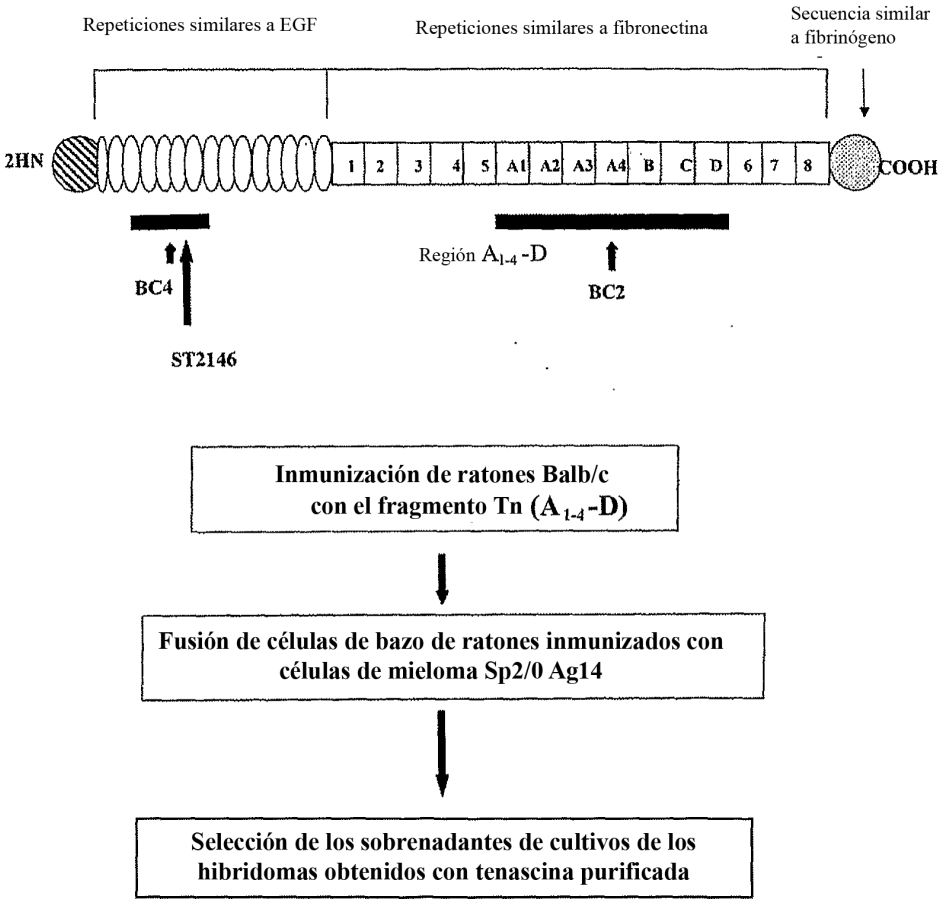
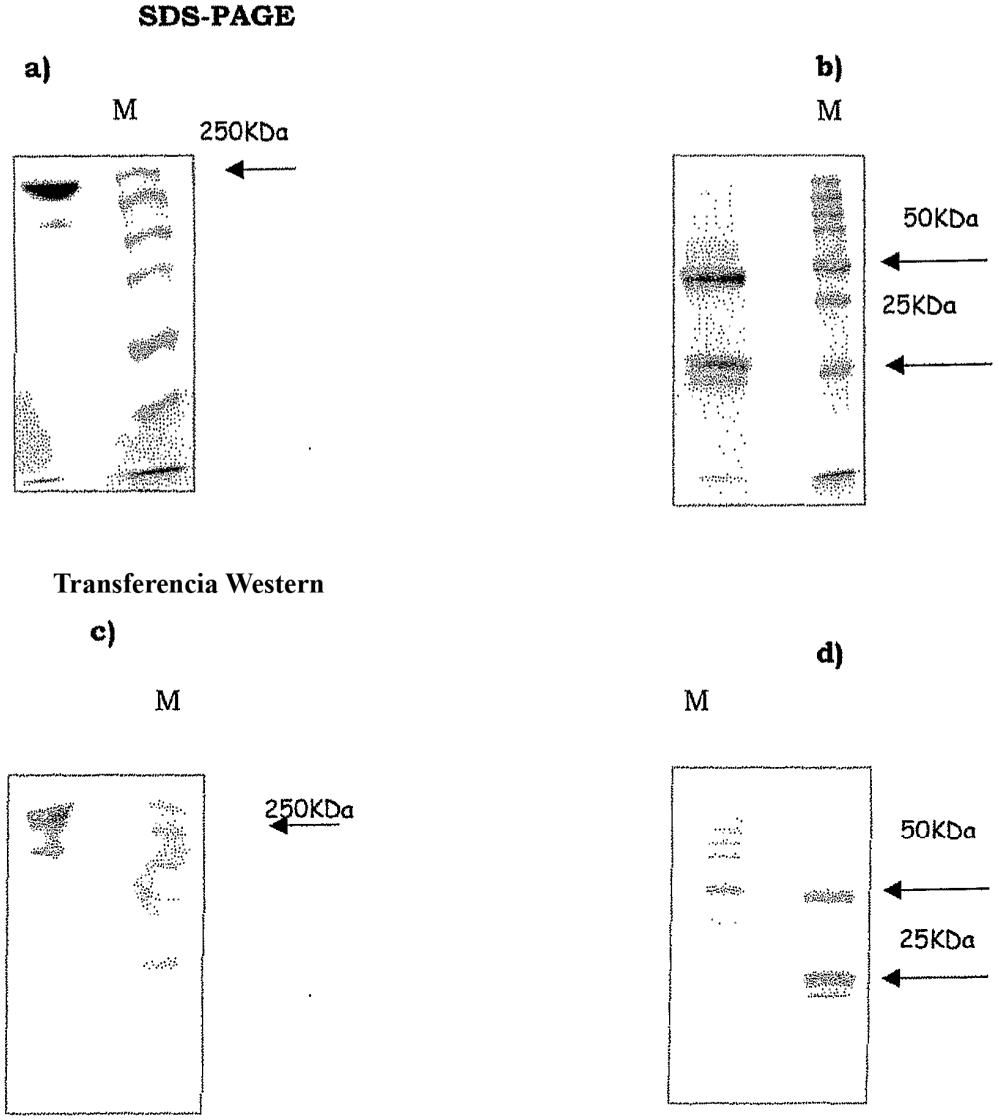


Figura 2

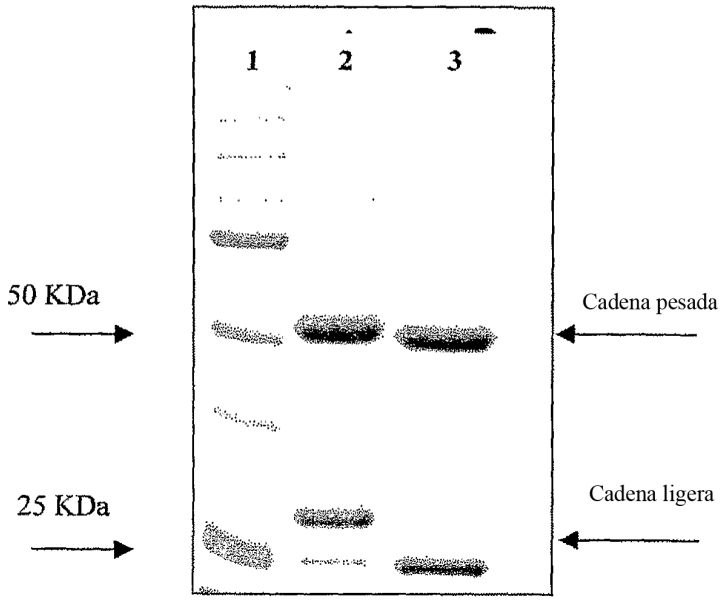
Análisis de SDS-PAGE y transferencia Western del anticuerpo ST2485, en condiciones reductoras (b, d) y no reductoras (a, c)



M: marcador de peso molecular

Figura 3

Digestión del anticuerpo ST2485 con la enzima péptido-N-glicosidasa (PNGasa F) de *Flavobacterium*



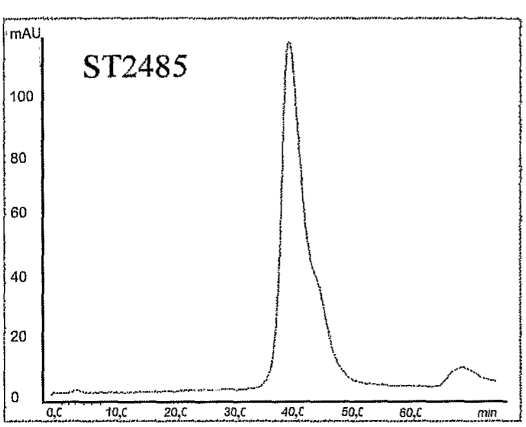
1: Marcador de peso molecular

2: ST2485 no digerido

3: ST2485 digerido con PNGasa F

Figura 4

Cromatografía de hidroxiapatito de los anticuerpos anti-tenascina BC-2 y ST2485



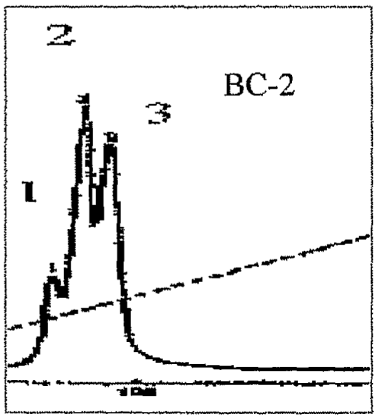
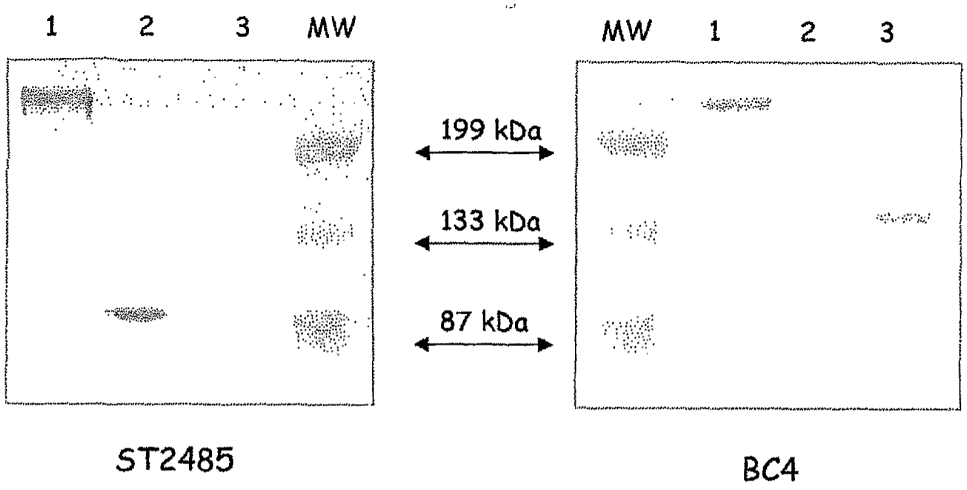


Figura 5

Análisis de la transferencia Western del anticuerpo anti-tenascina ST2485



1: Tenascina C

2: Fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D

3: Fragmento recombinante de la región similar a EGF de tenascina, que contiene el epitopo reconocido por el anticuerpo BC-4

MW: patrones de peso molecular

Figura 6

Ensayo ELISA competitivo entre ST2485 y BC-2 por la unión al antígeno

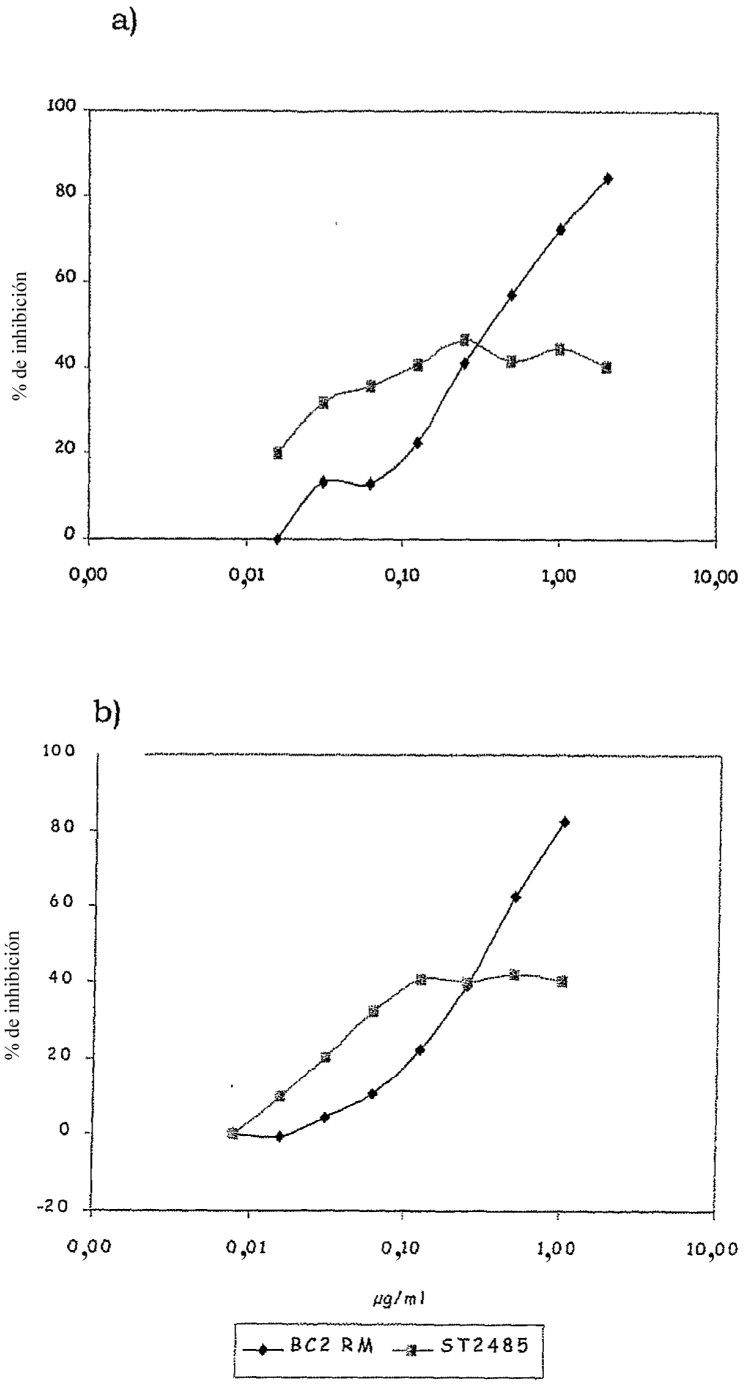
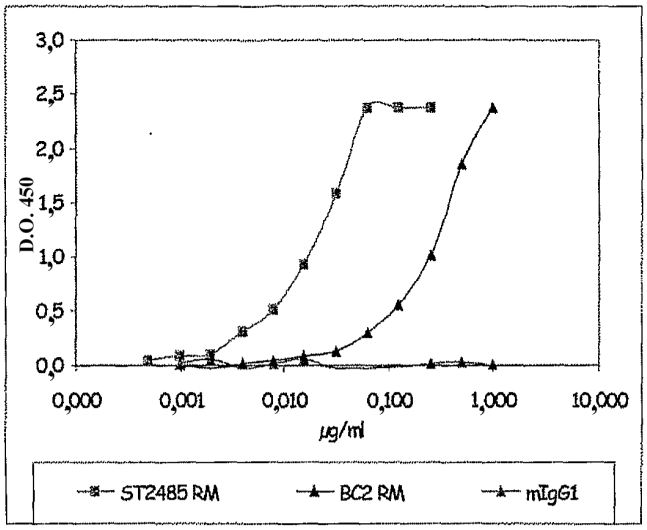


Figura 7

Inmunorreactividad del anticuerpo ST2485 en comparación con BC-2, con la tenascina C (a) y con el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D (b)

a)



b)

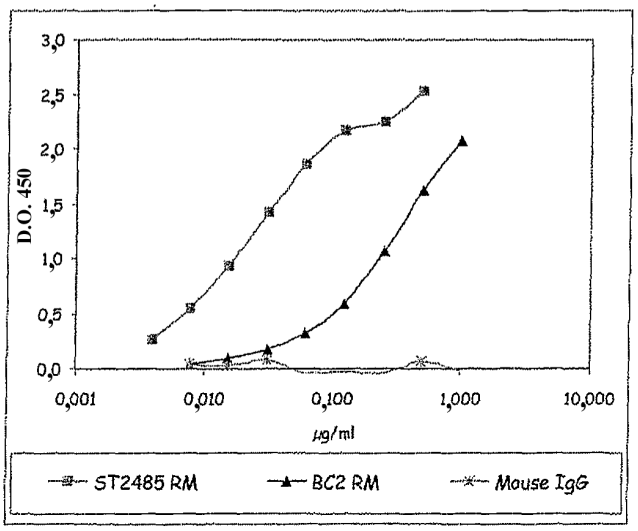
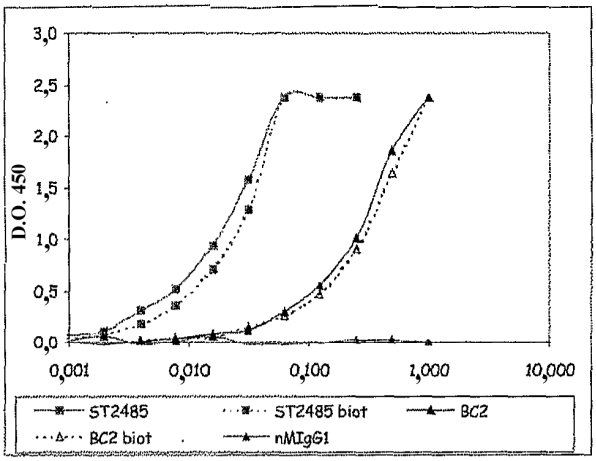
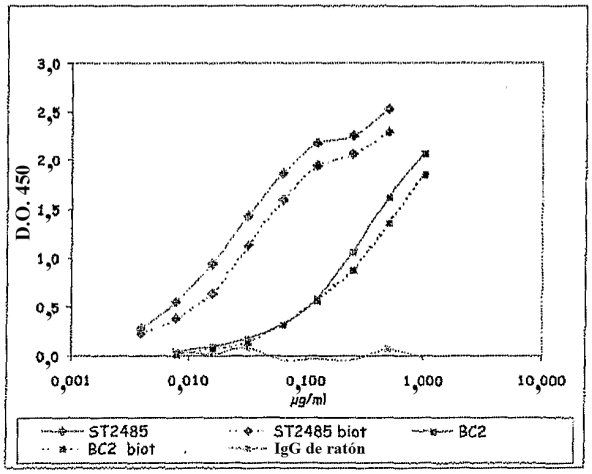


Figura 8

Inmunorreactividad de los anticuerpos ST2485 y BC-2 biotinilados y no biotinilados, con la tenascina C (a) y con el fragmento Tn $A_{(1-4)}$-D (b)



a)



b)

Figura 9

Reactividad cruzada del anticuerpo ST2485 con tenascina murina

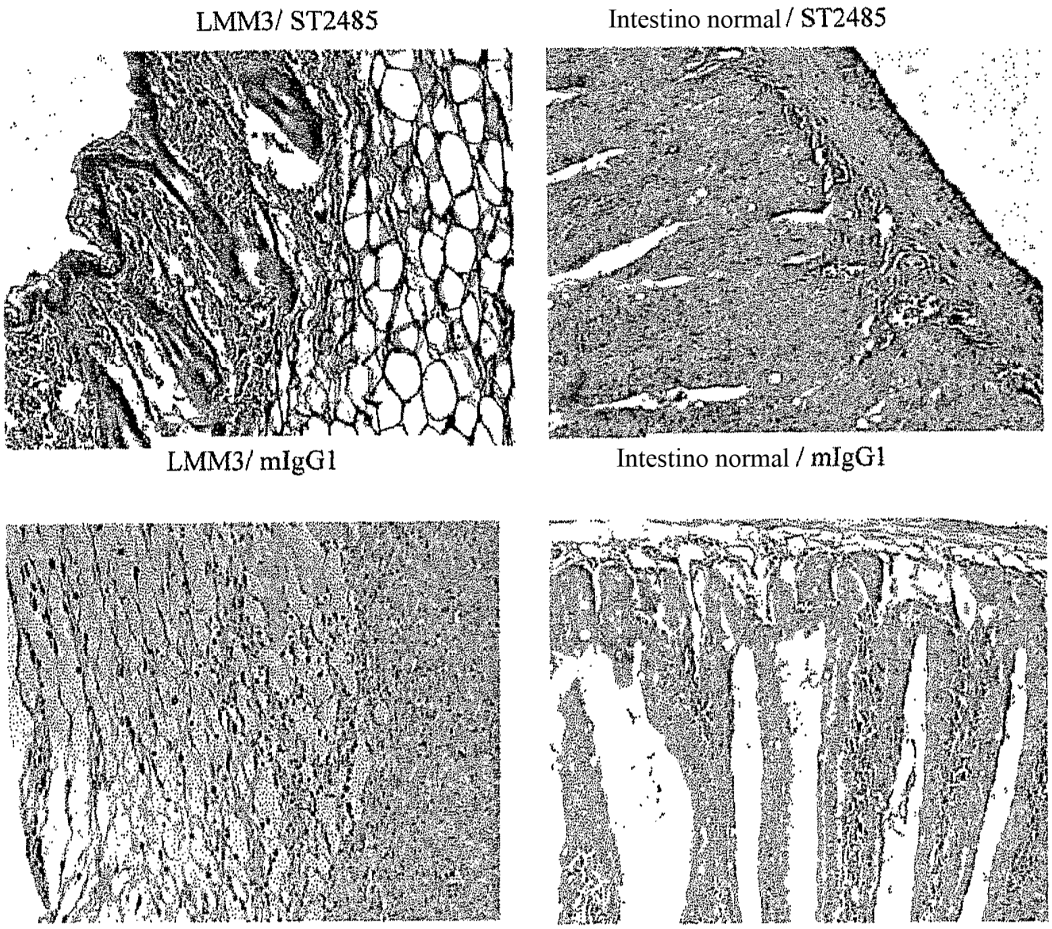


Figura 10

Protocolo del estudio de biodistribución de los anticuerpos ST2485 y BC-2 biotinilados en ratones atímicos con tumores implantados que expresan la tenascina humana

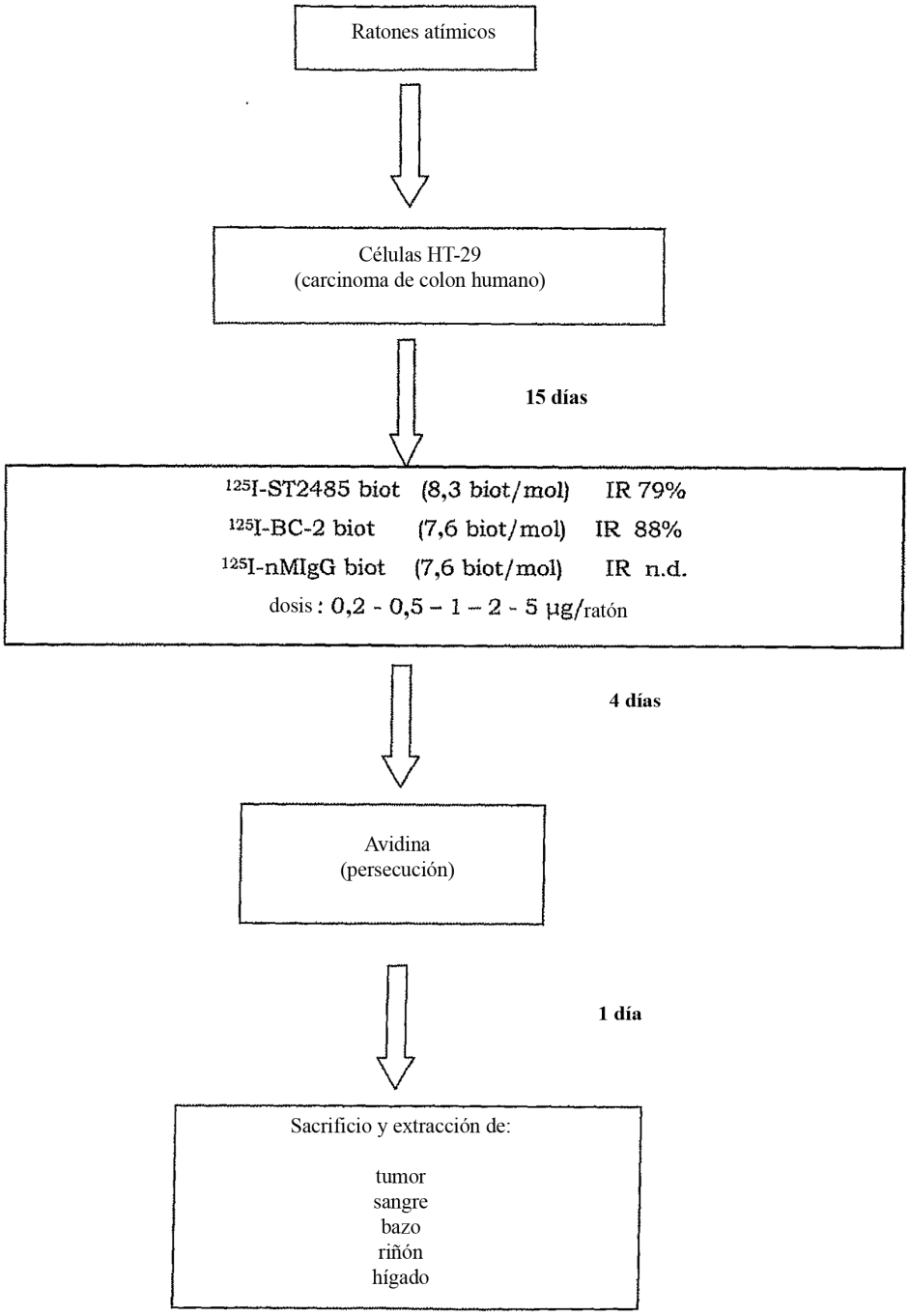
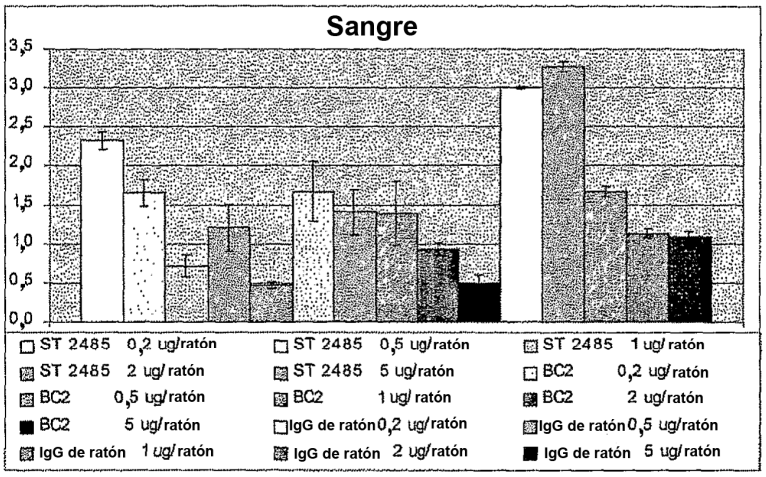


Figura 11

Biodistribución de ST2485 y BC-2 biotinilados en ratones atímicos transplantados con tumores que expresan tenascina. La cantidad de anticuerpo se expresa como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%I.D./gr).



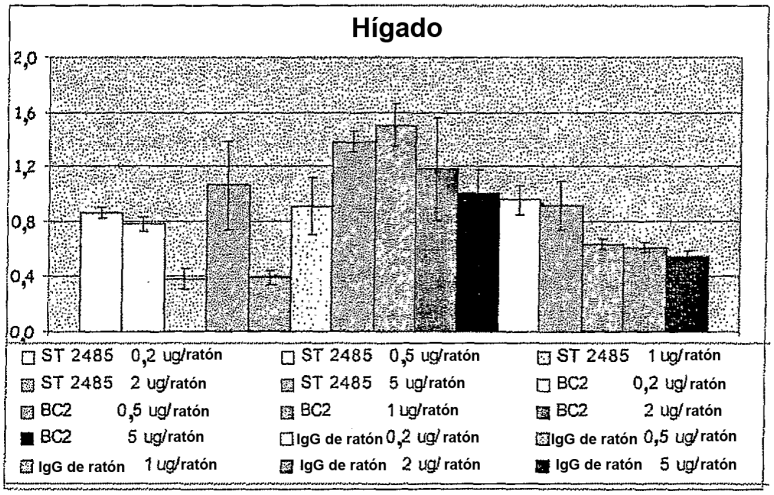
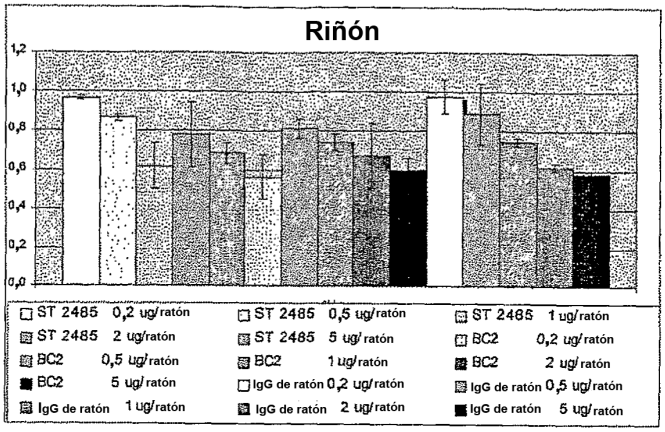
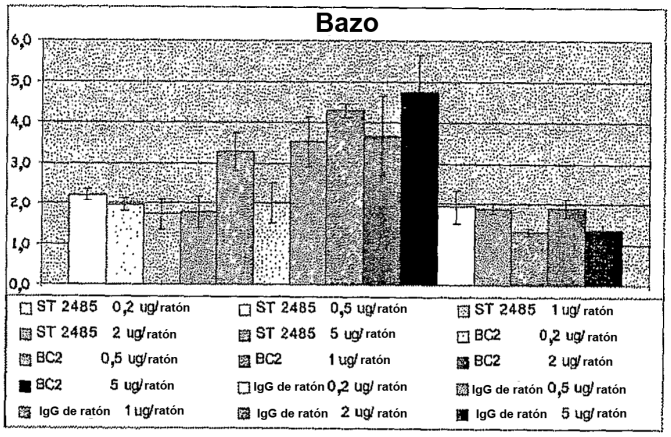


Figura 11a


Riñón
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ST 2485 0,2 ug/ratón
ST 2485 0,5 ug/ratón
ST 2485 1 ug/ratón
ST 2485 2 ug/ratón
ST 2485 5 ug/ratón
BC2 0,2 ug/ratón
BC2 0,5 ug/ratón
BC2 1 ug/ratón
BC2 2 ug/ratón
BC2 5 ug/ratón
IgG de ratón 0,2 ug/ratón
IgG de ratón 0,5 ug/ratón
IgG de ratón 1 ug/ratón
IgG de ratón 2 ug/ratón
IgG de ratón 5 ug/ratón


Bazo
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
ST 2485 0,2 ug/ratón
ST 2485 0,5 ug/ratón
ST 2485 1 ug/ratón
ST 2485 2 ug/ratón
ST 2485 5 ug/ratón
BC2 0,2 ug/ratón
BC2 0,5 ug/ratón
BC2 1 ug/ratón
BC2 2 ug/ratón
BC2 5 ug/ratón
IgG de ratón 0,2 ug/ratón
IgG de ratón 0,5 ug/ratón
IgG de ratón 1 ug/ratón
IgG de ratón 2 ug/ratón
IgG de ratón 5 ug/ratón

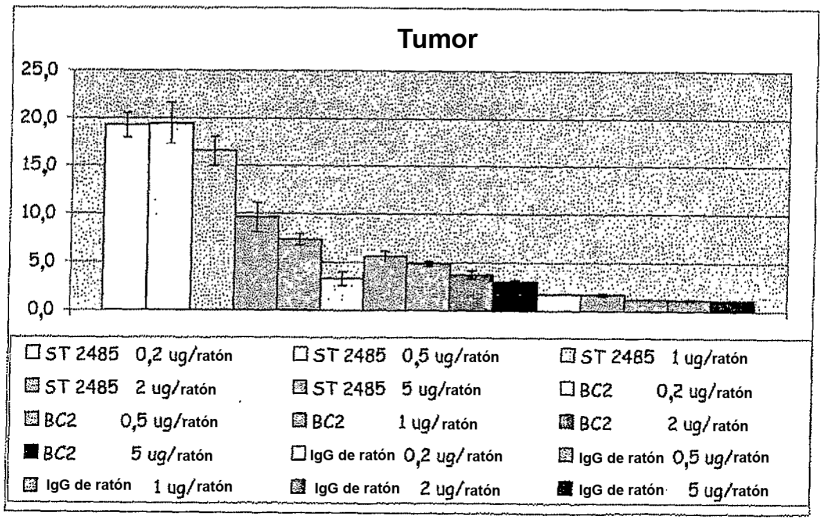
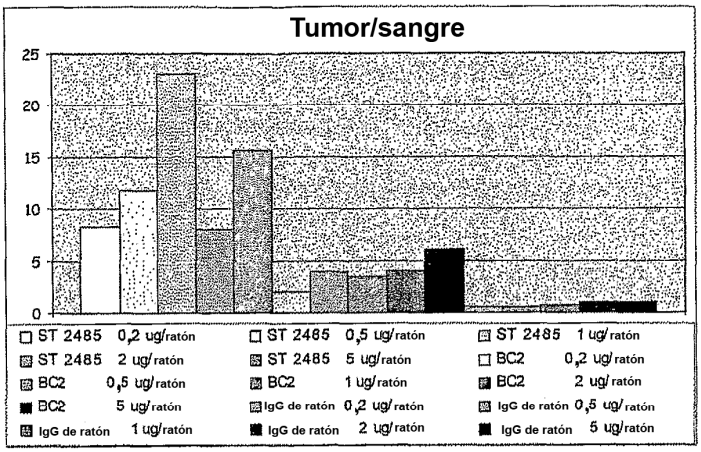

Tumor
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
ST 2485 0,2 ug/ratón
ST 2485 0,5 ug/ratón
ST 2485 1 ug/ratón
ST 2485 2 ug/ratón
ST 2485 5 ug/ratón
BC2 0,2 ug/ratón
BC2 0,5 ug/ratón
BC2 1 ug/ratón
BC2 2 ug/ratón
BC2 5 ug/ratón
IgG de ratón 0,2 ug/ratón
IgG de ratón 0,5 ug/ratón
IgG de ratón 1 ug/ratón
IgG de ratón 2 ug/ratón
IgG de ratón 5 ug/ratón

Figura 12

Biodistribución de ST2485 y BC-2 biotinilados en ratones atímicos: proporción tumor/no tumor



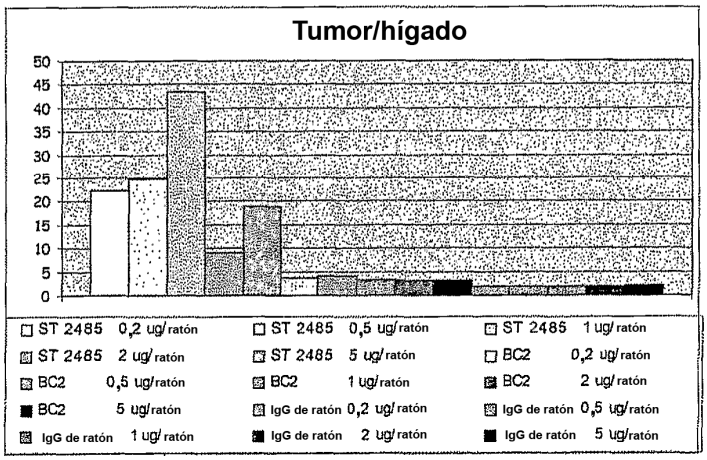
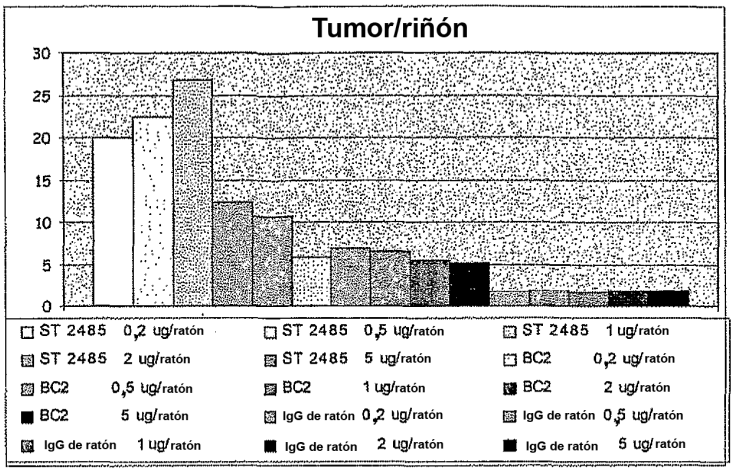


Figura 12a


Tumor/riñón
30
25
20
15
10
5
0
ST 2485 0,2 ug/ratón
ST 2485 0,5 ug/ratón
ST 2485 1 ug/ratón
ST 2485 2 ug/ratón
ST 2485 5 ug/ratón
BC2 0,2 ug/ratón
BC2 0,5 ug/ratón
BC2 1 ug/ratón
BC2 2 ug/ratón
BC2 5 ug/ratón
IgG de ratón 0,2 ug/ratón
IgG de ratón 0,5 ug/ratón
IgG de ratón 1 ug/ratón
IgG de ratón 2 ug/ratón
IgG de ratón 5 ug/ratón

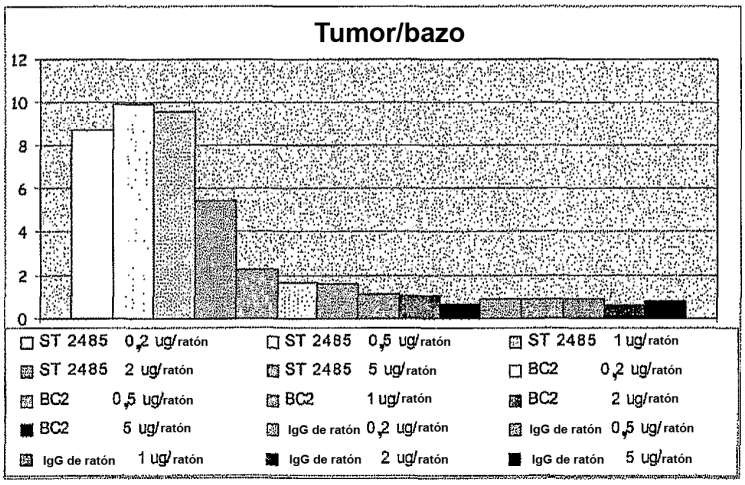
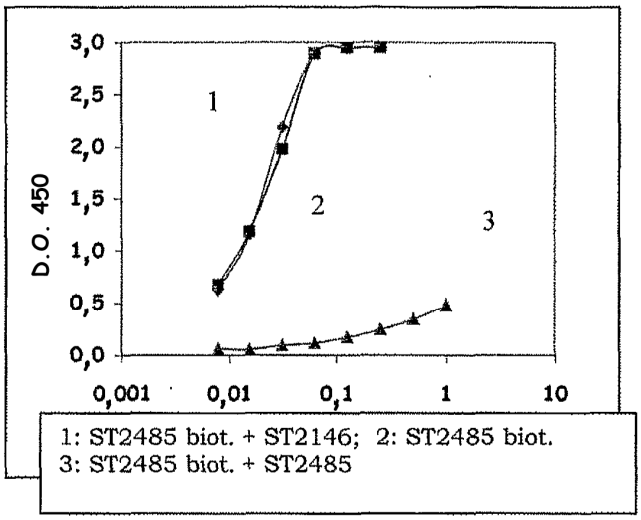

Tumor/bazo
12
10
8
6
4
2
0
ST 2485 0,2 ug/ratón
ST 2485 0,5 ug/ratón
ST 2485 1 ug/ratón
ST 2485 2 ug/ratón
ST 2485 5 ug/ratón
BC2 0,2 ug/ratón
BC2 0,5 ug/ratón
BC2 1 ug/ratón
BC2 2 ug/ratón
BC2 5 ug/ratón
IgG de ratón 0,2 ug/ratón
IgG de ratón 0,5 ug/ratón
IgG de ratón 1 ug/ratón
IgG de ratón 2 ug/ratón
IgG de ratón 5 ug/ratón

Figura 13

Evaluación *in vitro* de la interferencia (a) y la aditividad (b) de los anticuerpos anti-tenascina ST2485 y ST2146 mediante un ensayo ELISA

a) Interferencia



b) Aditividad

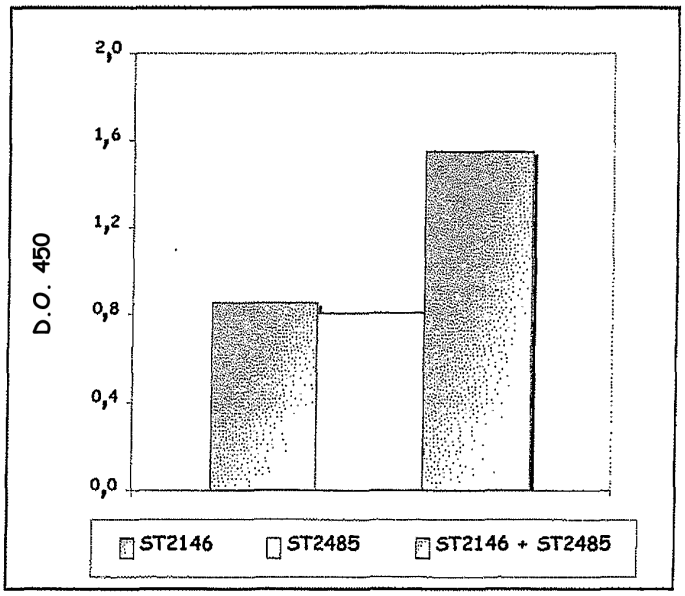
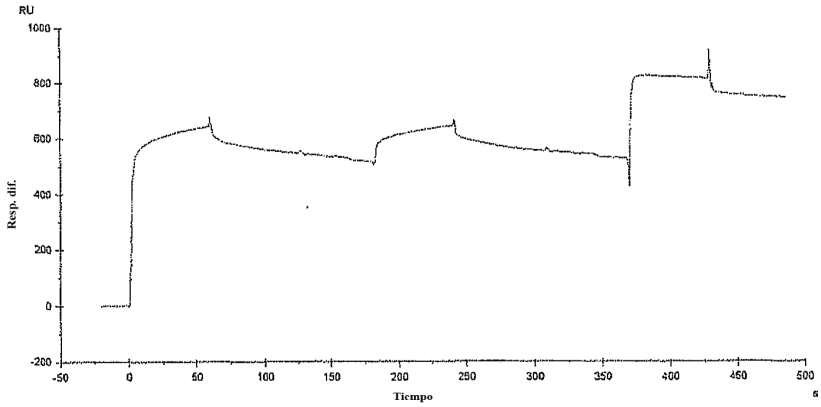


Figura 14

Aditividad *in vitro* de la unión a tenascina de los anticuerpos ST2485 y ST2146 mediante BIACore

a)



b)

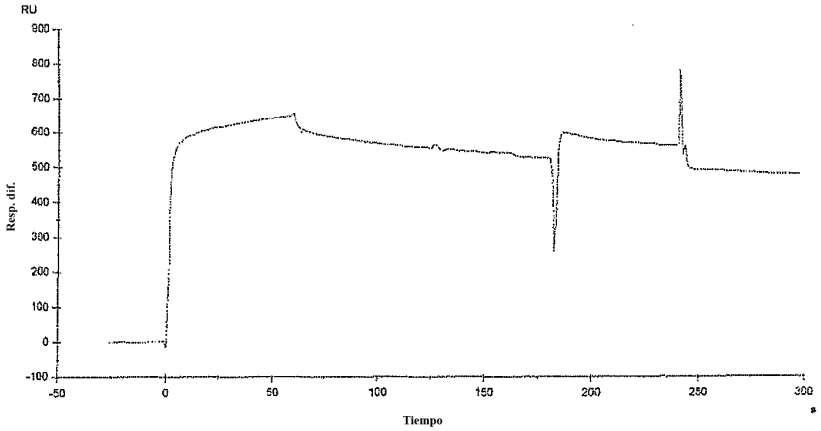
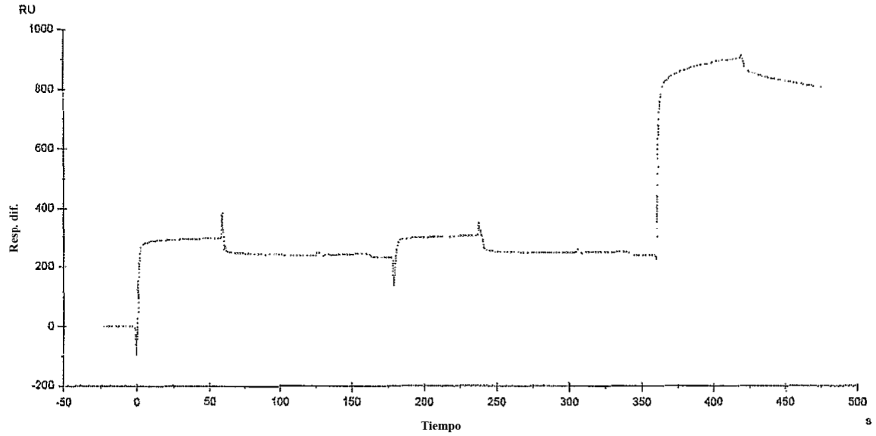
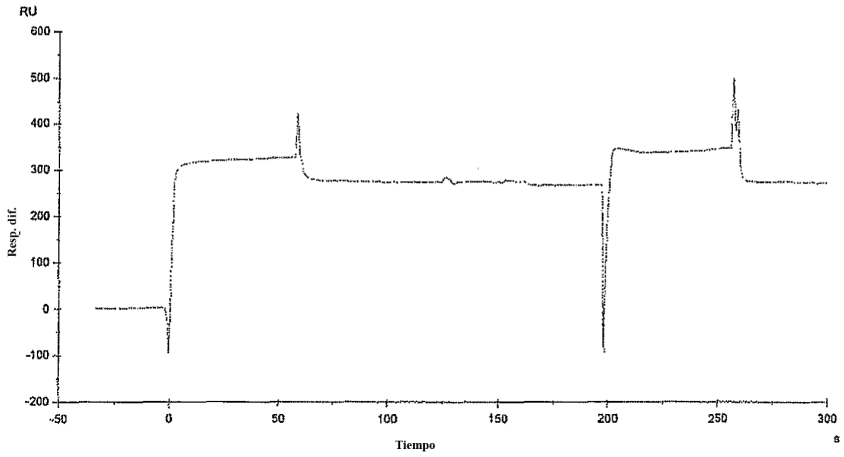


Figura 14a



c)



d)

Figura 15

Representación esquemática del estudio de aditividad *in vivo* en un modelo animal

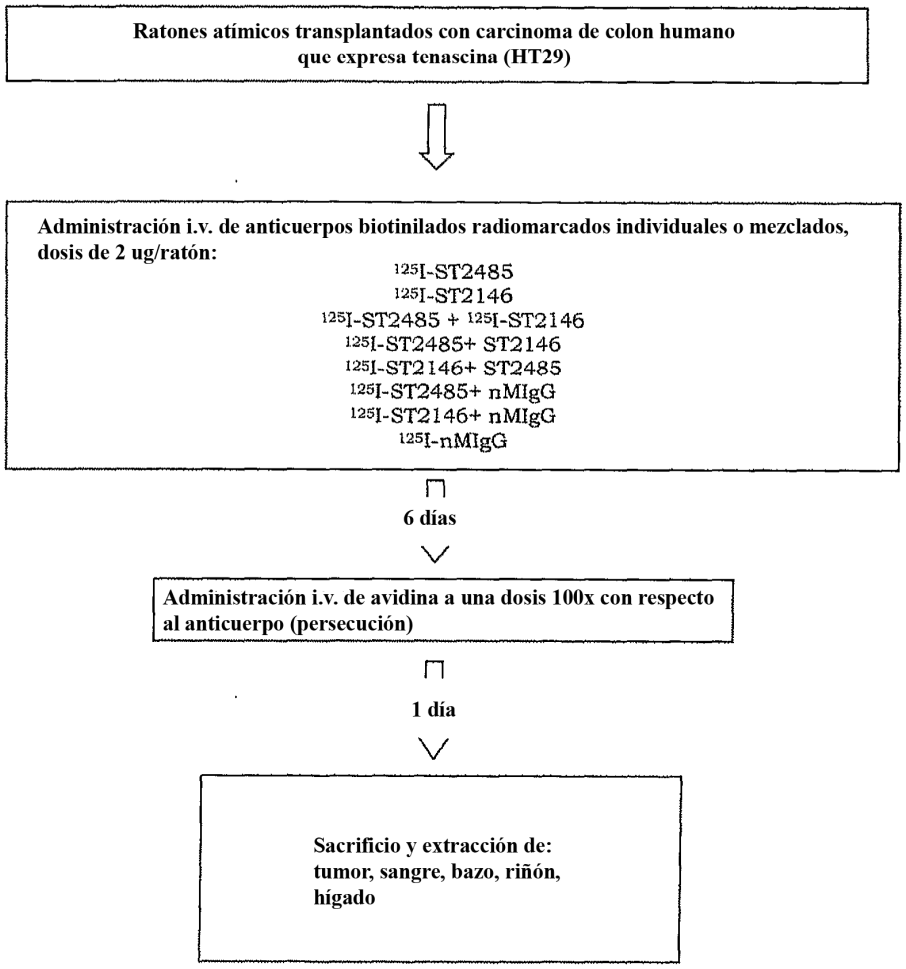


Figura 16

Aditividad de los anticuerpos ST2485 y ST2146 en un modelo animal; localización del asiento del tumor

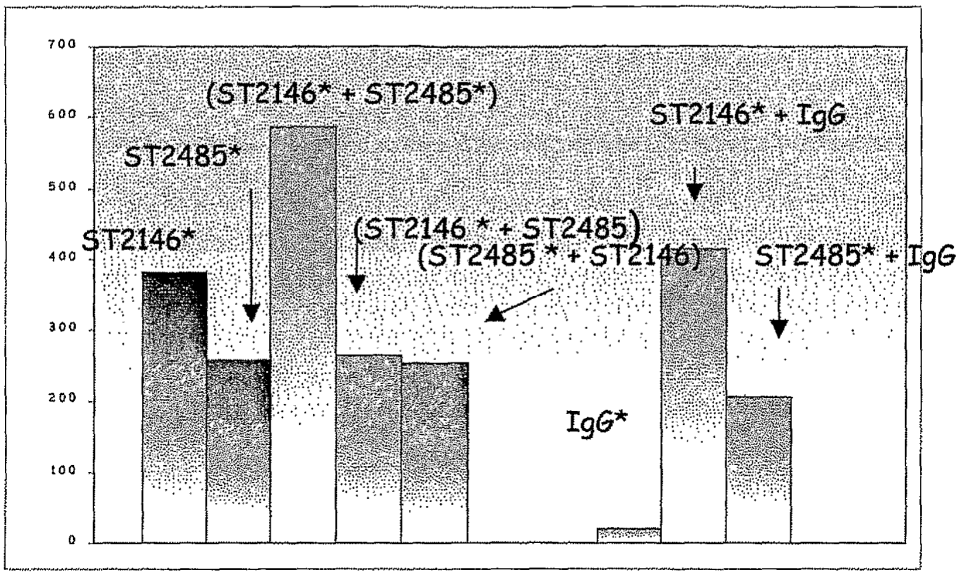


Figura 17

Secuencia SEQ ID 1 de la región variable de la cadena ligera kappa de ST2485 (VL)

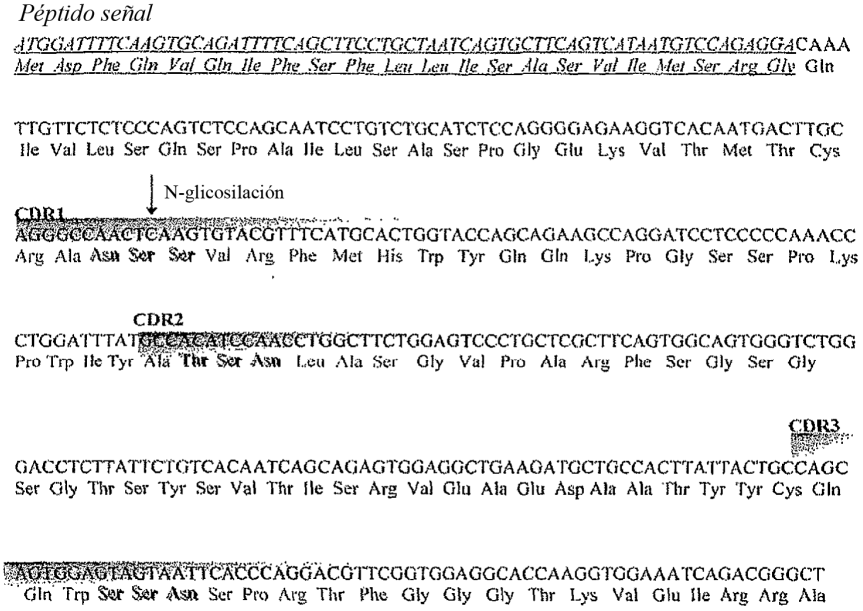


Figura 18

Secuencia SEQ ID 2 de la región variable de la cadena pesada gamma de ST2485 (VH)

Péptido señal

*ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCACTCT*GAGGTCCAGCTG
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu

CAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGG
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser

CDR1
TTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAATGGA
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp

CDR2
TTGGACTTATTAATCCTCACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACA
Ile Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

TTAACTGTAGACAAGTCATCCAACACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTC
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp

CDR3
TGCAGTCTATTACTGTACAAGACCCGGGGGGTTACTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Gly Gly Tyr Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

CCACGGTCACCGTCTCCTCA
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser