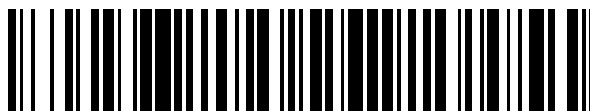


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 168**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2011 PCT/JP2011/052759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11099524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2011 E 11742267 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2535358**

54 Título: **Anticuerpo anti cadherina marcado con un metal radioactivo**

30 Prioridad:

**10.02.2010 JP 2010028028**

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

**23.02.2018**

73 Titular/es:

**FUJIFILM RI PHARMA CO., LTD. (50.0%)**

**14-1, Kyobashi 2-chome Chuo-ku**

**Tokyo 104-0031, JP y**

**PERSEUS PROTEOMICS INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HINO, AKIHIRO;**

**NAGANO, AKIO;**

**WATANABE, MASAHIKO;**

**MATSUURA, TADASI;**

**SATOH, HIROKAZU;**

**NOMURA, FUMIKO y**

**MITOMO, KATSUYUKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 656 168 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpo anti cadherina marcado con un metal radioactivo

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti cadherina-P marcado con metal que se acumula de forma altamente específica en células cancerosas, y a un agente terapéutico contra el cáncer y un agente diagnóstico para el cáncer, conteniendo cada uno el anticuerpo.

10

**Técnica anterior**

Hay una gran demanda de nuevas terapias contra el cáncer para el tratamiento del cáncer, que actualmente es la causa principal de muerte. Actualmente se emplean las terapias contra el cáncer tales como la terapia quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia (mediante el uso de un agente antineoplásico). Incluso tras la cirugía, se emplea un agente antineoplásico en una terapia posoperatoria.

15

Los agentes antineoplásicos utilizados actualmente incluyen un agente alquilante, un antimetabolito, un agente antineoplásico alcaloide, un agente antineoplásico antibiótico y un agente de platino. Los efectos en el tratamiento de estos agentes no son completamente satisfactorios. Algunos agentes no son específicos para células cancerosas y con frecuencia provocan efectos secundarios adversos, lo que es problemático. En tales circunstancias, existe una demanda para el desarrollo de agentes antineoplásicos más eficaces.

20

Entretanto, la cadherina es una molécula de adhesión dependiente de  $Ca^{2+}$  que se expresa en la superficie celular. Los ejemplos de especies de cadherina conocidas incluyen las cadherinas clásicas tales como la cadherina E, la cadherina N y la cadherina P (CDH3); así como la protocadherina y la cadherina desmosómica. Estas cadherinas son conocidas por unirse de forma homofílica para formar una unión de adherencia y para unirse al sistema del citoesqueleto (filamentos de actina) a través de la catenina intracelular, y se considera que controlan la adhesión celular mediante tal mecanismo.

25

30

Además de la adhesión celular, se cree que la cadherina está relacionada con la embriogénesis, la morfogénesis, la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica, y la infiltración y metástasis del cáncer. Por lo tanto, se informa que un anticuerpo anti cadherina es útil para la terapia contra el cáncer (Documentos de Patente 1 a 3).

**35 Documentos de la técnica anterior**

Documentos de patente

Documento de Patente 1: Publicación de Patente Japonesa *Kohyo* (PCT) N.º 2005-522982

40

Documento de Patente 2: Publicación de Patente Japonesa *Kohyo* (PCT) N.º 2008-538909

Documento de Patente 3: Publicación de Patente Japonesa *Kohyo* (PCT) N.º 2009-528257

El documento WO 2010001585 A1 divulga anticuerpos anti CDH3 que pueden estar marcados con un radioisótopo.

**45 Sumario de la invención****Problemas a resolver mediante la invención**

Sin embargo, el efecto antineoplásico del anticuerpo anti cadherina no es satisfactorio y ha habido una demanda para el desarrollo de un agente terapéutico contra el cáncer más potente.

50

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti cadherina marcado con material radioactivo que pueda acumularse de forma elevada en tejido canceroso. Otro objeto es proporcionar un agente terapéutico contra el cáncer que contenga el anticuerpo como principio activo y que presente un elevado efecto antineoplásico. Aún otro objeto es proporcionar un agente diagnóstico para el cáncer que pueda predecir la eficacia de un agente terapéutico contra el cáncer y confirmar el efecto terapéutico del mismo.

55

**Medios para resolver los problemas**

Los presentes inventores han realizado estudios extensos para lograr los objetos mencionado anteriormente y han descubierto que un anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo, en que el elemento metálico radioactivo está unido a un anticuerpo anti cadherina P a través de un reactivo quelante de metales, se acumula de forma específica en el tejido canceroso de un animal portador de cáncer y que el efecto antineoplásico del mismo está, en particular, notoriamente potenciado en comparación con el grupo de administración de anticuerpo anti cadherina P no marcado. La presente invención se ha llevado a cabo sobre la base de estos hallazgos.

60

65

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo que se obtiene mediante la unión de un elemento metálico radioactivo a un anticuerpo anti cadherina P, a través de un reactivo quelante de metales, donde el anticuerpo anti cadherina P es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo recombinante producido por una célula productora de anticuerpos representada por un número de referencia NITE BP-897, NITE BP-899, NITE BP-1048, NITE BP-1049 o NITE BP-1050, o un fragmento de unión a cadherina P de cualquiera de estos anticuerpos, y un agente terapéutico contra el cáncer y un agente diagnóstico para el cáncer conteniendo cada uno, como principio activo, el anticuerpo anti cadherina P marcado con material radioactivo.

La presente invención también proporciona el anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo para su uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer.

La presente invención también proporciona el uso del anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo para la producción de un agente terapéutico contra el cáncer o un agente diagnóstico para el cáncer.

### Efectos de la invención

El agente terapéutico contra el cáncer que contiene, como principio activo, el anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo de la presente invención se acumula de forma elevada en tejido canceroso y presenta un gran efecto de contracción del tejido canceroso. Por lo tanto, mediante el uso del agente terapéutico contra el cáncer puede llevarse a cabo de forma eficaz la terapia contra el cáncer sin provocar efectos secundarios adversos. Además, mediante el uso del agente de diagnóstico para el cáncer de la presente invención puede predecirse la eficacia del agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención y puede confirmarse el efecto terapéutico del mismo.

### Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] Gráfico que muestra el resultado de la afinidad de los anticuerpos evaluada mediante citometría de flujo.

[Fig. 2] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2016 (proporción de adición de 1:10) 96 horas tras la administración del mismo.

[Fig. 3] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2016 (proporción de adición de 1:3) 96 horas después la administración del mismo.

[Fig. 4] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2029 (proporción de adición de 1:10) 96 horas después la administración del mismo.

[Fig. 5] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2029 (proporción de adición de 1:3) 96 horas después la administración del mismo.

[Fig. 6] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2025 (proporción de adición de 1:10) 96 horas después la administración del mismo.

[Fig. 7] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2025 (proporción de adición de 1:3) 96 horas después de la administración del mismo.

[Fig. 8] Biodistribución del anticuerpo  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PPMX2025 en el caso de las proporciones de anticuerpo-DOTA añadidas de 1:1, 1:3 y 1:10, 96 horas después de la administración del mismo.

[Fig. 9] Biodistribución del anticuerpo  $^{111}\text{In}$ -DOTA-PPAT-052-27c (proporción de adición de 1:3) 96 horas después de la administración del mismo.

[Fig. 10] Biodistribución del anticuerpo  $^{111}\text{In}$ -DOTA-PPAT-052-27c (proporción de adición de 1:3) 48 horas después de la administración del mismo.

[Fig. 11] Biodistribución del anticuerpo  $^{111}\text{In}$ -DOTA-PPAT-052-28c (proporción de adición de 1:3) 48 horas y 96 horas después de la administración del mismo.

[Fig. 12] Efecto antitumoral del anticuerpo  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-PPMX2029 (proporción de adición de 1:3) en un modelo de xenoinjerto.

[Fig. 13] Efecto antitumoral del anticuerpo  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-PPAT-052-27c (proporción de adición de 1:3) en un modelo de xenoinjerto.

[Fig. 14] Imágenes fotográficas que muestran los resultados de la tinción inmunohistoquímica para confirmar la expresión de la proteína CDH3.

### Modos de llevar a cabo la invención

El anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo de la presente invención es un anticuerpo anti cadherina P marcado al que se une un elemento metálico radioactivo a través de un reactivo quelante de metales. El agente terapéutico contra el cáncer o el agente diagnóstico del cáncer contiene el anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo.

El anticuerpo anti cadherina P se une de forma específica a la cadherina P.

El anticuerpo anti cadherina P es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

De acuerdo con la presente divulgación, el tipo de anticuerpo anti cadherina P no está particularmente limitado y pueden emplearse de forma apropiada anticuerpos tales como un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de oveja, un anticuerpo de camello y un anticuerpo de pollo, y anticuerpos recombinantes génicos que se modifican intencionalmente para reducir la heteroantigenicidad frente al ser humano tal como un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. El anticuerpo recombinante puede producirse a través de un método conocido. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo formado por las regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de mamífero que no sea un anticuerpo humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y puede producirse uniendo un fragmento de ADN que codifica la región variable del anticuerpo de ratón a un fragmento de ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano, incorporando el fragmento resultante en un vector de expresión e incorporando el vector en células hospedadoras (véase, por ejemplo, Cabilly S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81(11) 3273-7; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81(21), 6851-5 y Solicitud de Patente Europea abierta a inspección N.º 171496). El anticuerpo humanizado, que también se denomina un anticuerpo remodelado, es un anticuerpo producido a través del trasplante de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo de mamífero que no sea un anticuerpo humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en una CDR de un anticuerpo humano y, en general, las técnicas de recombinación de genes para ello son conocidas. En concreto, se sintetiza a través de PCR una secuencia de ADN que incluye una CDR de un anticuerpo de ratón unida a una región marco conservada (FR) de un anticuerpo humano, utilizando varios oligonucleótidos que se producen para tener una parte solapante en un extremo de los mismos. El fragmento de ADN así obtenido se une a un fragmento de ADN que codifica la región constante del anticuerpo humano, posteriormente el fragmento resultante se incorpora en un vector de expresión y el vector se incorpora en células hospedadoras para, de este modo, producir el anticuerpo humanizado (véase los documentos EP239400 A y WO 96/02576 A). La FR del anticuerpo humano unida a través de la CDR se selecciona de las FR que tienen una CDR que forma un sitio de unión a antígeno adecuado. Si es necesario, puede sustituirse un aminoácido en la FR de la región variable del anticuerpo de forma que una CDR del anticuerpo humanizado forme un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res., 1993, 53, 851-856).

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo quimérico o del anticuerpo humanizado tiene preferentemente una identidad del 100% con la de la región VH o VL del ADNc que expresa un hibridoma depositado. Debido a la modificación genética, también es preferente un anticuerpo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 90% o mayor. En el procedimiento de humanización o quimerización, se ha llevado a cabo de forma convencional tal sustitución de restos controlada para mejorar la unión a un antígeno. Tal anticuerpo, que tiene una secuencia parcialmente modificada, se considera esencialmente que es un anticuerpo que se origina a partir del hibridoma original.

Ya se conocen métodos de producción de un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado basados en una técnica de ingeniería genética. En concreto, las secuencias de VH y VL de un anticuerpo monoclonal que sirve como un grupo confirmado se modifican genéticamente y después se realiza la quimerización o humanización a través de una técnica de rutina.

El método para recuperar un anticuerpo humano también es conocido. En un procedimiento, se sensibilizan linfocitos humanos *in vitro* con un antígeno de interés o con células que expresan el antígeno, y los linfocitos así sensibilizados se fusionan con células de mieloma humanas, por ejemplo, U266, para producir de este modo un anticuerpo humano de interés que tenga una actividad de unión al antígeno (véase el documento JP-B-1989-59878). Como alternativa, puede recuperarse un anticuerpo humano de interés a través de la inmunización con un antígeno de interés de un animal transgénico que tenga un repertorio completo del gen del anticuerpo humano (véanse los documentos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO96/34096 y WO96/33735). También se conoce una técnica para recuperar un anticuerpo humano a través de selección mediante el uso de una biblioteca de anticuerpos humanos. En un procedimiento, a través del método de presentación en fagos se expresa una región variable de un anticuerpo humano como un anticuerpo monocatenario (scFv) sobre la superficie de fagos y puede seleccionarse un fago que se une al antígeno. A través de análisis génico del fago así seleccionado, puede determinarse una secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno. Cuando la secuencia de ADN del scFv que se une al antígeno se dilucida, puede producirse un vector de expresión apropiado a partir de la secuencia, mediante lo cual puede recuperarse un anticuerpo humano de interés. Estos métodos son ampliamente conocidos (véanse los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388).

Estos anticuerpos anti cadherina P pueden ser una molécula de anticuerpo pequeña tal como un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo modificado o similar, siempre que se mantenga la capacidad de reconocimiento de toda o una parte de la proteína que codifica el gen de la cadherina. Los ejemplos del fragmento de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv y diacuerpo. Tal fragmento de anticuerpo puede producirse construyendo un gen que codifique el fragmento de anticuerpo, incorporando el gen en un vector de expresión y expresando el vector en células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M.S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A.H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669, y Bird, R.E. y Walker, B.W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Como anticuerpo modificado puede utilizarse un anticuerpo que esté enlazado a cualquiera de diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). Tal anticuerpo modificado puede producirse a través de una modificación química del anticuerpo obtenido. La técnica de modificación de anticuerpos ya se ha establecido en la técnica.

5 En la presente invención, además puede emplearse un anticuerpo modificado con una cadena de azúcar para potenciar la actividad citotóxica. Ya se conocen las técnicas de modificación de la cadena de azúcar en un anticuerpo (por ejemplo, documento WO 00/61739 y documento WO 02/31140).

10 El anticuerpo anti cadherina P de la presente divulgación también abarca un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad frente a dos o más antígenos distinto. Un ejemplo típico de tal molécula puede ser una que puede unirse a dos antígenos (es decir, un anticuerpo biespecífico). El "anticuerpo multiespecífico" de la presente invención incluye un anticuerpo que tiene una especificidad por dos o más (por ejemplo, tres) antígenos. El anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de tal anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico F(ab')<sub>2</sub>).

15 El anticuerpo anti cadherina P de la presente invención y el fragmento de anticuerpo de unión a cadherina P del mismo pueden producirse a través de cualquier método adecuado, tal como *in vivo*, en células cultivadas, una reacción de traducción *in vitro* y un sistema de expresión de ADN recombinante.

20 Las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales y de células productoras de anticuerpos (hibridomas) se conocen en general en la técnica (Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology," Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos, 1984 y St. Groth *et al.*, J. Immunol. Methods 35: 1-21, 1980). En un procedimiento concreto, una proteína o un fragmento de la misma codificadas por un gen de cadherina, que sirve como un inmunógeno, se inyecta por vía subcutánea o intraperitoneal para la inmunización de cualquier animal (por ejemplo, conejo o ratón) que se sabe que producen un anticuerpo. En la inmunización puede emplearse un adyuvante y tal adyuvante es bien conocido en la técnica.

25 El anticuerpo policlonal puede producirse aislando un antisuero que contenga anticuerpos a partir de un animal inmunizado y explorando la presencia de un anticuerpo que tenga una especificidad de diana, a través de una técnica bien conocida en la materia (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western o radioinmunoensayo).

30 El anticuerpo monoclonal puede producirse retirando células esplénicas de un animal inmunizado y fusionando las células con células de mieloma, para producir de este modo hibridomas que puedan producir anticuerpos monoclonales. Las células de hibridoma productoras de un anticuerpo que puede reconocer una proteína de interés o un fragmento de la misma pueden seleccionarse a base de técnicas bien conocidas en la materia (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western o radioinmunoensayo). Después, el hibridoma que secreta un anticuerpo de interés se clona y las células obtenidas se cultivan en condiciones apropiadas. El anticuerpo así secretado se recupera y se purifica a través de un método bien en conocido en la técnica (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico o cromatografía de afinidad). En un procedimiento alternativo, puede producirse un anticuerpo monoclonal mediante el uso de una cepa de xenorratón (véase, Green, J. Immunol. Methods 231: 11-23, 1999 y Wells, Eek, Chem. Biol. agosto de 2000; 7(8): R185-6). Actualmente se lleva a cabo la producción de anticuerpos monoclonales a base de presentación en fagos que no implica inmunización. El anticuerpo monoclonal de la presente invención es un anticuerpo de especie molecular única producido por una única especie de células productoras de anticuerpos o un fragmento de ADN obtenido del mismo y que codifica el anticuerpo. El anticuerpo monoclonal puede producirse a través de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

35 El fragmento de ADN que codifica un anticuerpo monoclonal puede aislarse fácilmente y secuenciarse a través de un método de rutina (por ejemplo, mediante el uso de una sonda de oligonucleótido que se una de forma específica a genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal). La célula de hibridoma es un material de partida preferente para producir tal fragmento de ADN. Después del aislamiento, tal fragmento de ADN se inserta en un vector de expresión y el vector de expresión se recombina en células hospedadoras tales como células *E. coli*, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, en las que no se produce inmunoglobulina a menos que las células estén transformadas. Las células hospedadoras recombinantes producen el anticuerpo monoclonal de interés. En un modo alternativo, puede aislarse un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo a partir de una librería de anticuerpos en fagos producida a través de una técnica de McCafferty *et al.* (Nature 348: 552-554 (1990)).

40 La célula hospedadora empleada para la expresión de anticuerpos monoclonales es preferentemente una célula hospedadora de origen de mamífero. Puede seleccionarse la célula hospedadora más adecuada para el anticuerpo monoclonal que se va a expresar. La célula hospedadora no está limitada y los ejemplos típicos de la misma incluyen la línea celular que proviene de CHO (células de ovario de hámster chino), CV1 (riñón de mono), COS (derivada de CV1, que expresa el antígeno SV40T), SP2/0 (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), 293 (riñón humano) y 293T (derivada de 293, que expresa el antígeno SV40T). El sistema de célula hospedador puede obtenerse a partir de una instalación comercial, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o de una organización que haya publicado un documento relevante.

65

La célula hospedadora es, preferentemente, una línea celular originada en CHO defectuosa en la expresión del gen dhfr (deleción de la expresión del gen dhfr) o SP2/0 (véase Urland, G. *et al.*, Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions; *Somat. Cell. Mol. Genet.* Vol. 12, 1986, pág. 5555-566 y Schulman, M. *et al.*, A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, *Nature* Vol. 276, 1978, pág. 269-270). Más preferentemente la célula hospedadora es una CHO con DHFR delecionado. La transfección de un plásmido en células hospedadoras puede realizarse a través de cualquier técnica. La técnica de transfección no está limitada y los ejemplos específicos de la misma incluyen la transfección (que incluye el método por fosfato de calcio, el método por DEAE, la lipofección y la electroporación), la incorporación de ADN mediante el uso de una envoltura (por ejemplo, virus Sendai), microinyección e infección mediante el uso de un vector vírico (por ejemplo, retrovirus o adenovirus) (véase *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 9 Introduction of DNA into Mammalian Cells, John Wiley and Sons, Inc.). Entre ellas, es particularmente preferente la incorporación de un plásmido en células hospedadoras a través de electroporación.

El sitio de reconocimiento en la cadherina del anticuerpo anti cadherina P de la presente invención es preferentemente una región de 1 a 655 de la SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo anti cadherina P de la presente invención se produce preferentemente a partir del hibridoma PPMX2016 o PPMX2029, o de una línea celular CHO transgénica PPAT-052-27c, PPAT-052-28c o PPAT-052-29c. En la presente memoria descriptiva, los números añadidos a PPMX o PPAT se proporcionan a las correspondientes células productoras de anticuerpo o a los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos.

El metal radioactivo que está enlazado al anticuerpo anti cadherina P es preferentemente un metal radioactivo citotóxico cuando el anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo se utiliza como un agente terapéutico contra el cáncer y es un metal radioactivo no citotóxico cuando el anticuerpo anti cadherina P marcado con un metal radioactivo se utiliza como un agente para el diagnóstico del cáncer.

Los ejemplos de metal radioactivo citotóxico incluyen el itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), hierro-59 ( $^{59}\text{Fe}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), oro-198 ( $^{198}\text{Au}$ ), mercurio-203 ( $^{203}\text{Hg}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), disprosio-165 ( $^{165}\text{Dy}$ ), rutenio-103 ( $^{103}\text{Ru}$ ), bismuto-212 ( $^{212}\text{Bi}$ ), bismuto-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ) y lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ).

Entre estos metales radioactivos son preferentes  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$  y  $^{177}\text{Lu}$ , desde el punto de vista de la semivida, la energía de radiación, la facilidad de la reacción de marcaje, el porcentaje de marcaje, la estabilidad del complejo, etc.

El metal radioactivo no citotóxico empleado de forma adecuada en un agente diagnóstico para cáncer no está limitado y los ejemplos del mismo incluyen el tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), indio-113m ( $^{113\text{m}}\text{In}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), cromo-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ), cobalto-57 ( $^{57}\text{Co}$ ), cobalto-58 ( $^{58}\text{Co}$ ), cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), estroncio-85 ( $^{85}\text{Sr}$ ), mercurio-197 ( $^{197}\text{Hg}$ ) y cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ).

Para enlazar un elemento metálico radioactivo al anticuerpo anti cadherina P, de un modo preferente se hace reaccionar el reactivo quelante de metales con el anticuerpo anti cadherina P y el producto se hace reaccionar adicionalmente con un elemento metálico radioactivo, para formar de este modo un complejo. En el anticuerpo modificado así producido, el elemento metálico radioactivo está enlazado al anticuerpo anti cadherina P a través del reactivo quelante de metales.

Los ejemplos de reactivo quelante de metales para formar tal complejo incluyen (1) derivados de quinolina tales como 8-hidroxiquinolina, 8-acetoxiquinolina, 8-hidroxiquinolina, sulfato de oxiquinolina, O-acetiloxina, O-benzoiloxina, O-p-nitrobenzoiloxina y compuestos de quinolona, que tienen un esqueleto de quinolina (por ejemplo, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, tosfloxacina, feroxacin y esparfloxacina); (2) compuestos tales como ácido cloranílico, aluminón, tiourea, pirogalol, cupferrón, Bismutiol (II), ácido galoil gálico, tiolida, 2-mercaptobenzotiazol y cloruro de tetrafenilarsonio; (3) ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y compuestos que tengan un esqueleto similar (dihidroxiethylglicina, ácido diaminopropanoltetraacético, ácido etilendiaminodiacético, clorhidrato del ácido etilendiaminodipropionico, ácido hidroxietilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetraquis(metilensulfónico), glicoléter del ácido diaminotetraacético, ácido hexametildiaminotetraacético, ácido hidroxietiliminodiacético, ácido iminodiacético, ácido diaminopropanotetraacético, ácido nitrilotriacético, ácido nitrilotripropiónico, ácido nitrilo-tris(metilensulfónico) sal trisódica, ácido tritrietilaminohexaacético, metil DTPA, ciclohexil DTPA, aminobencil EDTA, isotiocianobencil EDTA, isotiocianobencil DTPA, metilisotiocianobencil DTPA, ciclohexilisotiocianobencil DTPA, maleimidopropilamidobencil EDTA, maleimidopentilamidobencil EDTA, maleimidodecilamidobencil EDTA, maleimidopentilamidobencil DTPA y maleimidodecilamidobencil DTPA) y (4) ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclono-1,4,7-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclodecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA), 1,4,7,10-tetraazaciclodecano (Cyclen), 1,4,8,11-tetraazaciclodecano (Cyclam), isotiocianobencil DOTA e isotiocianobencil NOTA.

Entre estos reactivos quelantes de metales, son preferentes isotiocianobencil DOTA, metilisotiocianobencil DTPA, ciclohexilisotiocianobencil DTPA, desde el punto de vista de la facilidad de la reacción de incorporación del quelato de metales al anticuerpo, el porcentaje de marcaje, la estabilidad del complejo, etc.

- 5 El elemento metálico radioactivo puede estar enlazado al anticuerpo anti cadherina P a través de un método de rutina. En un procedimiento, se hace reaccionar un reactivo quelante de metales con un anticuerpo anti cadherina P, para de este modo preparar un precursor de marcador y el precursor se hace reaccionar con un elemento metálico radioactivo.
- 10 En el agente terapéutico contra el cáncer y el agente diagnóstico para el cáncer de la presente invención, la proporción en moles de anticuerpo anti cadherina P con respecto al reactivo quelante de metales es importante para la acumulación en las células cancerosas y el efecto antineoplásico. La proporción en moles (anticuerpo anti cadherina P : reactivo quelante) es preferentemente de 1 : 0,1 a 1 : 4,5, más preferentemente de 1 : 0,5 a 1 : 3.
- 15 Para conseguir tales proporciones en moles, el anticuerpo anti cadherina P y el reactivo quelante se añaden preferentemente para reaccionar a una proporción de 1 : 0,1 a 1 : menos de 5, en particular preferentemente 1 : 1 a 1 : 3. La cantidad de molécula (o moléculas) quelante por anticuerpo anti cadherina P puede calcularse midiendo el peso molecular a través de análisis de masas MALDI-TOF o una técnica similar, y comparando el peso molecular de un anticuerpo no modificado con el de un anticuerpo modificado (Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 7514078, Lu *et al.*, J. Pharm. Sci. 94(4), 2005, pág. 788-79 y Tedesco *et al.*, J. Clin. Onco. 23 (16S), 2005, 4765).
- 20 Como alternativa, la cantidad de molécula (o moléculas) quelante por anticuerpo anti cadherina P puede determinarse a través de una titulación quelatométrica. Un método conocido emplea un reactivo colorimétrico de metal alcalinotérreo (arsenazo III) (Bradyr *et al.*, Nucl. Med. Biol. 31, 795-802, 2004 y Dadachova *et al.*, Nucl. Med. Biol. 26, 977-982, 1999).
- 25 El agente terapéutico contra el cáncer o el agente de diagnóstico para el cáncer de la presente invención puede proporcionarse como una formulación marcada o una formulación en kit que contiene un precursor de marcador. En la presente invención puede emplearse cualquiera de las dos formulaciones. En el caso de la formulación marcada, puede administrarse un agente terapéutico contra el cáncer o un agente diagnóstico para el cáncer que contiene un anticuerpo anti cadherina P marcado tal cual es. En el caso de una formulación en kit, el agente puede administrarse
- 30 tras el marcaje con un elemento metálico radioactivo de interés.

El anticuerpo anti cadherina P que contiene un elemento metálico radioactivo enlazado al mismo se acumula de forma elevada en el tejido canceroso y presenta una elevada actividad tóxica para las células cancerosas. Por lo tanto, el anticuerpo es un agente terapéutico contra el cáncer útil que daña menos los tejidos que no son tejidos cancerosos y que tiene una alta seguridad. Además, el anticuerpo anti cadherina P que contiene un elemento

35 metálico radioactivo enlazado al mismo tiene una actividad antineoplásica notoriamente mayor que la del correspondiente anticuerpo anti cadherina P. La actividad antineoplásica es notoriamente elevada en particular cuando la proporción en moles del anticuerpo con respecto al agente quelante es de 1 : 0,1 a 1 : 4,5.

- 40 El agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención puede utilizarse en combinación con otro agente antineoplásico. Los ejemplos de tal agente antineoplásico incluye un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de microtúbulos, un agente antineoplásico antibiótico, un inhibidor de la topoisomerasa, un agente de platino, un fármaco para diana molecular, un agente hormonal y productos biológicos. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen agentes antineoplásicos de mostaza nitrogenada (por ejemplo, ciclofosfamida), agentes
- 45 antineoplásicos de nitrosourea (por ejemplo, ranimustina) y dacarbacina. Los ejemplos de antimetabolito incluyen 5-FU, UFT, carmofur, capecitabina, tegafur, TS-1, gemcitabina y citarabina. Los ejemplos de inhibidor de los microtúbulos incluyen agentes antineoplásicos alcaloides (por ejemplo, vincristina) y agentes antineoplásicos de taxano (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel). Los ejemplos del agente neoplásico antibiótico incluyen mitomicina C, doxorubicina, epirubicina, daunorubicina y bleomicina. Los ejemplos de inhibidor de la topoisomerasa incluyen
- 50 irinotecan y nogitecan, que tienen actividad inhibidora de la topoisomerasa I, y etopósido que tiene actividad inhibidora de la topoisomerasa II. Los ejemplos del agente de platino incluyen cisplatino, paraplato, nedaplato y oxaliplatino. Los ejemplos del fármaco para diana molecular incluyen trastuzumab, rituximab, imatinib, gefitinib, erlotinib, bevacizumab, bortezomib, sunitinib y sorafenib. Los ejemplos del agente hormonal incluyen dexametasona, finasteride y tamoxifeno. Los ejemplos de productos biológicos incluyen los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , e interleucina 2.

- 55 El agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención puede utilizarse en combinación con una terapia contra el cáncer. Los ejemplos de terapia contra el cáncer incluyen cirugía, radioterapia (incluyendo terapia con bisturi de rayos gamma, terapia con ciberbisturí, terapia con captura de neutrones de boro y radioterapia de iones pesados/de haz de protones), cirugía por ultrasonidos enfocados guiada por RM, crioterapia, ablación por
- 60 radiofrecuencia, terapia de inyección percutánea de etanol y emboloterapia.

El agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención es eficaz en diversos cánceres de un mamífero (incluyendo un ser humano). Los ejemplos del cáncer diana incluyen carcinomas tales como cáncer faríngeo, cáncer laríngeo, cáncer de lengua, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer prostático, melanoma maligno y cáncer de tiroides; y sarcomas tales como osteosarcoma,

65

condrosarcoma, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma, liposarcoma, angiosarcoma, fibrosarcoma, leucemia, linfoma maligno y mieloma.

5 El agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención puede disolverse en una solución acuosa, preferentemente un tampón fisiológicamente adaptable tal como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológica tamponada. Además, el agente terapéutico puede tener la forma de una suspensión, solución, emulsión o similar, en un vehículo oleoso o acuoso.

10 La dosificación del agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención, que varía en conformidad con los síntomas, la vía de administración, el peso corporal, la edad, etc. de un paciente que lo necesite, es preferentemente, por ejemplo, de 37 a 3.700 Mbp para el tratamiento de un adulto.

15 El agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención en general se administra por vía parenteral. Por ejemplo, el agente terapéutico contra el cáncer se inyecta (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, vía intraperitoneal) o se administra por vía transdérmica, vía transmucosal, vía transnasal, vía transpulmonar, etc.

20 El agente de diagnóstico para el cáncer de la presente invención puede utilizarse en la formación de imágenes de tumores. En el caso en donde un paciente tiene un tumor en el cual se expresa la proteína CDH3, el agente de diagnóstico para el cáncer de la presente invención se acumula en el tumor. Por lo tanto, pueden formarse imágenes del tumor detectando la radiación mediante un aparato tal como un tomógrafo computarizado de emisión monofotónica (SPECT, forma siglada de *single photon emission computed tomograph*), un tomógrafo por emisión de positrones (PET, forma siglada de *positron emission tomograph*) o una cámara de centelleo. Por ejemplo, mediante el uso de un agente de diagnóstico para el cáncer de la presente invención, el efecto terapéutico del agente terapéutico contra el cáncer de la presente invención puede predecirse antes de la administración del agente terapéutico. El agente de diagnóstico se administra al paciente antes del tratamiento y se forman imágenes del tumor. Cuando se observa una alta acumulación, el efecto superior del agente terapéutico puede predecirse como potente. El agente de diagnóstico puede utilizarse para determinar el efecto terapéutico. El agente de diagnóstico de la presente invención se administra a un paciente que ha recibido el tratamiento con el agente terapéutico de la presente invención o cualquier otro tratamiento, para formar imágenes del tumor. A través del control de la variación dependiente del tiempo de la acumulación del agente de diagnóstico puede observarse la expansión o contracción del tumor a lo largo del tiempo.

35 El anticuerpo para su uso como un agente de diagnóstico reconoce preferentemente un epítipo competitivo con el agente terapéutico. Más preferentemente, el anticuerpo reconoce el mismo epítipo que el reconocido por el agente terapéutico. Muy preferentemente, el agente terapéutico y el agente de diagnóstico son el mismo anticuerpo.

40 El agente de diagnóstico para el cáncer de la presente invención se administra en general a un sujeto por vía intravenosa. Sin embargo, el agente de diagnóstico para el cáncer también puede administrarse por vía arterial. La dosificación del mismo, que varía en conformidad con los síntomas, la vía de administración, el peso corporal, la edad, etc., de un paciente que lo necesite, es preferentemente, por ejemplo, de 37 a 1.120 MBq para un tratamiento de adulto.

### 45 Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación en detalle por medio de ejemplos, que no deben considerarse como limitantes de la invención. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

50 Ejemplo 1: Producción de un antígeno CDH3 soluble

La proteína CDH3 soluble (sCDH3) en la cual la región transmembrana C terminal se había delecionado se produjo para servir como un inmunógeno para producir un anticuerpo anti CDH3.

55 (1) Producción de un vector de expresión de antígeno CDH3 soluble

Se realizó PCR mediante el uso de un ADNc CDH3 de longitud completa como molde y de un cebador directo (SEQ ID NO: 3: CGCGGTACCATGGGGCTCCCTCGT, (hCDH3FullFW)) y un cebador inverso (SEQ ID NO: 4: CCGTCTAGATAAACCTCCCTTCCAGGGTCC, (hCDH3SolbRV)), que se habían diseñado para amplificar un segmento correspondiente con la región extracelular de CDH3 (1-654 en la SEQ ID NO: 2, en lo sucesivo denominado en el presente documento sCDH3ADNc). La reacción se realizó mediante el uso de KOD-Plus (producto de Toyobo) y en las siguientes condiciones: 94 °C-15 s, 55 °C-30 s y 68 °C-90 s (30 ciclos).

65 Tras la finalización de la reacción de PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se cortó un trozo de gel que contenía la banda del tamaño buscado (aproximadamente 2,0 kpb). El sCDH3ADNc diana se recuperó del trozo de gel mediante el uso del kit de extracción en gel QIA quick (producto de Qiagen).



Para insertar sCDH3ADNc en un vector de expresión pEF4/myc-HisB, se trató sCDH3ADNc con las dos enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*. Los fragmentos así obtenidos se insertaron en pEF4/myc-HisB, que se había tratado con las mismas enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*, mediante el uso de ADN ligasa T4 a través de una técnica rutinaria, mediante lo cual se produjo el vector de expresión pEF4-sCDH3-myc-His.

5

## (2) Expresión de la proteína CDH3 soluble

De acuerdo con el protocolo del agente de transfección FuGENE6, el día anterior a la transfección se inocularon  $8 \times 10^5$  células CHO en una placa de 10 cm de diámetro, y las células se cultivaron durante una noche. Después de eso, se mezclaron el vector de expresión pEF4-sCDH3-myc-His (8 µg) y el reactivo FuGENE6 (16 µl) con medio RPMI 1640 sin suero (400 µl), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla resultante se añadió al líquido del cultivo celular para la transfección. Dos días después de la transfección, se realizó la clonación a través de dilución limitante mediante el uso de un reactivo de selección (Zeocin).

10

15

Se seleccionaron células CHO que expresaban CDH3 soluble a través de transferencia de Western mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti c-Myc (producto de SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY). Las líneas celulares que presentaban un elevado nivel de secreción en el sobrenadante de cultivo y una proliferación elevada se seleccionaron para obtener una línea celular CHO que expresaba CDH3 soluble (EXZ1702). Las células CHO que expresaban CDH3 soluble así seleccionadas (EXZ1702) se cultivaron durante 72 horas en tres frascos rotativos (cada una con superficie de cultivo: 1500 cm<sup>2</sup>) con medio CHO-S-SFM-II sin suero (333 ml/frasco) (producto de Invitrogen) y se recuperaron los sobrenadantes de cultivo. El sobrenadante de cultivo así obtenido se sometió a cromatografía de afinidad por medio de una columna HP His Trap (marca registrada) (producto de GE Healthcare Bioscience) y cromatografía de filtración en gel por medio de una columna de 200 µg de Superdex (marca registrada) (producto de GE Healthcare Bioscience), para de este modo adquirir la proteína CDH3 soluble.

20

25

## Ejemplo 2: Establecimiento de una línea celular CHO que expresa CDH3

Para obtener una línea celular para la exploración de anticuerpos anti CDH3, se estableció una línea celular CHO que expresaba CDH3 de longitud completa.

30

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

Para insertar el ADN de CDH3 humano de longitud completa, representado por la SEQ ID NO: 1, en el vector de expresión en mamífero pEF4/myc-HisB (producto de Invitrogen), se trató el ADN de CDH3 humano de longitud completa con las dos enzimas de restricción *KpnI* (producto de Takara Bio Inc.) y *XbaI* (producto de Takara Bio Inc.) a 37 °C durante una hora. El fragmento así obtenido se insertó en pEF4/myc-HisB que se había tratado con las mismas enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*, mediante el uso de ADN ligasa T4 (producto de Promega) a través de una técnica rutinaria, mediante lo cual se produjo el vector de expresión pEF4-CDH3-myc-His.

35

40

### (2) Adquisición de una línea estable que expresaba CDH3

De acuerdo con un protocolo del reactivo de transfección FuGENE (marca registrada) 6 (producto de Roche Diagnostics K.K.), el día anterior a la transfección se inocularon  $8 \times 10^5$  células CHO en una placa de 10 cm de diámetro y las células se cultivaron durante una noche. Después de eso, se mezclaron el vector de expresión pEF4-CDH3-myc-His (8 µg) y el reactivo FuGENE6 (16 µl) con medio RPMI 1640 sin suero (producto de SIGMA-ALDRICH) (400 µl), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla resultante se añadió al líquido del cultivo celular para la transfección. Dos días después de la transfección, se realizó la clonación a través de dilución limitante mediante el uso de un reactivo de selección (Zeocin).

45

50

Se seleccionaron clones de CHO que expresaban CDH3 de longitud completa a través de transferencia de Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti c-Myc (producto de SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY). Como resultado, se seleccionó la línea celular CHO que expresaba CDH3 de longitud completa (EXZ1501) como la línea celular que presentaba un elevado nivel de expresión y una elevada proliferación. La reacción entre EXZ1501 y un anticuerpo anti CDH3 comercial (producto de R&D SYSTEMS) se confirmó a través de citometría de flujo. Es decir, se confirmó la expresión de la proteína CDH3 en la membrana celular de EXZ1501.

55

## Ejemplo 3: Producción de anticuerpos monoclonales anti CDH3

### (1) Producción de anticuerpos monoclonales mediante el uso de proteína CDH3 soluble como inmunógeno

60

Se mezcló la proteína CDH3 soluble (50 µg) disuelta en solución salina fisiológica con una cantidad equivalente de Titer-MAX Gold (marca registrada) (producto de Titer Max) y la mezcla se inyectó por vía intraperitoneal y vía subcutánea a ratones MRL/lpr (Japan SLC inc.) para una inmunización inicial. Los posteriores procedimientos de inmunización se realizaron mediante inyección por vía intraperitoneal y vía subcutánea en los ratones, de una mezcla de proteína CDH3 soluble (25 µg) y Titer-MAX Gold preparada de la misma manera. Tres días después de la inmunización final, se prepararon en condiciones asépticas células esplénicas de los ratones y las células se

65

fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/O-Ag14 o P3-X63-Ag8.653, mediante el método generalmente empleado de polietilenglicol.

(2) Selección de hibridomas productores de anticuerpos anti CDH3

5 La selección de los anticuerpos anti CDH3 se realizó a través de citometría de flujo mediante el uso de la línea celular CHO que expresaba CDH3 de longitud completa (EXZ1501).

10 En concreto, se retiraron de una placa de cultivo células CHO que expresaban CDH3 de longitud completa (EXZ1501) tratando con EDTA-PBS 2 mM y suspendiendo en solución de FACS a una concentración de células de  $1 \times 10^6$  células/ml. La suspensión celular se inoculó en una placa de 96 pocillos hasta una concentración de 50  $\mu$ l/pocillos y se añadió un sobrenadante de cultivo de hibridoma a la misma, seguido de la reacción a 4 °C durante 60 minutos. La placa se lavó dos veces con solución de FACS (200  $\mu$ l/pocillo) y se añadió a la misma F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (producto de Invitrogen), seguido de la reacción a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente, la placa se lavó dos veces con solución de FACS y se realizó citometría de flujo, para de este modo seleccionar hibridomas productores de un anticuerpo que se une a las células CHO que expresan CDH3. Como resultado, se obtuvieron los 40 clones PPMX2016 a PPAT-052-28. A través de citometría de flujo se confirmó que todos los hibridomas reaccionaban con las células CHO que expresaban CDH3 (EXZ1501) y NCI-H358, pero que no reaccionaban con las células CHO. Los anticuerpos se purificaron del sobrenadante de cultivo de hibridoma mediante una columna de proteína G y se emplearon en experimentos posteriores. Entre los hibridomas seleccionados, PPMX2016 (NITE BP-897), PPMX2025 (NITE BP-898), PPMX2029 (NITE BP-899), PPAT-052-02 (NITE BP-1034), PPAT-052-03 (NITE BP-1035), PPAT-052-09 (NITE BP-1036), PPAT-052-24 (NITE BP-1037), PPAT-052-25 (NITE BP-1038), PPAT-052-26 (NITE BP-1039) y PPAT-052-28 (NITE BP-1040) se depositaron en la Agencia Administrativa Incorporada, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario de Microorganismos de Patentes (2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazushi, Chiba, Japón) el 10 de febrero de 2010 y el 18 de enero de 2011.

Ejemplo 4: Clonación de genes de anticuerpos

30 (1) Se clonó a través del siguiente procedimiento el fragmento de ADN que codificaba la región V de un anticuerpo monoclonal de ratón frente a CDH3 humana. Se aisló ARN citoplasmático de las células de hibridoma de ratón a través de un método divulgado en un documento (Gough "Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells", Analytical Biochemistry, 173, pág. 93-95 (1988)), con la condición de que en lugar del tampón de disolución divulgado en el documento se empleó el tampón TNE (es decir, Tris-HCl 25 mM, pH: 7,5; NP-40 al 1%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM, pH: 8,0). Más en concreto, se suspendieron 5 x 10<sup>6</sup> células de hibridoma en el tampón TNE (200  $\mu$ l), para de este modo disolver las membranas celulares, y se retiraron los núcleos celulares a través de centrifugación. Al sobrenadante de citoplasma así obtenido (aproximadamente 200  $\mu$ l) se añadió un tampón de extracción ((Tris-HCl 10 mM, pH: 7,5; NaCl 0,35 M; SDS al 1% (p/v); EDTA 10 mM, pH: 8,0; urea 7 M) (200  $\mu$ l). La mezcla se sometió a extracción con fenol y cloroformo. A la solución de ARN así obtenida se le añadió glucógeno (producto de Roche, n.º de Cat. 901393) que sirve como vehículo. Después, se añadió etanol para precipitar el producto. El precipitado de ARN se disolvió en agua destilada esterilizada (10 a 50  $\mu$ l) hasta una concentración de ARN citoplasmático de 0,5 a 2  $\mu$ g/ $\mu$ l.

(2) Producción de una biblioteca de ADNc a partir del ARN preparado de los hibridomas

45 Para sintetizar un ADNc monocatenario, se preparó una mezcla de reacción (20  $\mu$ l) que contenía el ARN citoplasmático anteriormente preparado (0,5 a 3  $\mu$ g), Tris-HCl 50 mM (pH: 8,3, temperatura ambiente), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y DTT 10 mM), un cebador aleatorio (100 ng), dNTP 0,5 mM y Superscript II (transcriptasa inversa, producto de Invitrogen) (200 unidades). La mezcla se incubó a 42 °C durante 50 minutos. La biblioteca de ADNc así sintetizada se empleó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin realizar ningún tratamiento posterior.

(3) Amplificación a través de PCR de un gen que codifica una región variable de un anticuerpo anti CDH3

Todos los cebadores empleados en los experimentos fueron sintetizados por Hokkaido System Science Co., Ltd.

55 A. Cebadores para su uso en la amplificación por PCR de un gen que codifica la región V de la cadena L de ratón

60 Se emplearon los siguientes dos conjuntos de cebadores: (i) un cebador de ADN que tenía en el extremo 5' homología con la parte FR1 y 4 conjuntos de cebadores que tenían en el extremo 3' homología con un gen de la cadena J en la cadena L de ratón, y (ii) y 7 conjuntos cebadores que tenían en el extremo 5' homología con la parte de señal de la cadena L y un cebador antisentido que tenía en el extremo 3' homología con la parte KC (cebador antisentido KVL). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de los dos conjuntos de cebadores, mediante lo cual se obtuvo, a partir del ADNc, un fragmento de ADN de la región variable de la cadena L de la inmunoglobulina de ratón. Las secuencias de los cebadores son las siguientes.

65

## ES 2 656 168 T3

(i) 4 conjuntos de cebadores sentido para la clonación de la región variable de la cadena L de ratón

Hokkaido System Science Co., Ltd sintetizó 17 cebadores sentido y 3 cebadores inversos, de acuerdo con "Phage Display -A Laboratory Manual", Barbas Burton Scott Silverman," PROTOCOLO 9.5.

5 VK sentido (parte de FR1)

Como cebador de VK sentido se empleó una mezcla de los siguientes 17 cebadores.

10 5'-GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC-3' (degeneración 2): SEQ ID NO: 5  
5'-GAY ATT GTT CTC WCC CAG TC-3' (degeneración 4): SEQ ID NO: 6  
5'-GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC-3' (degeneración 8): SEQ ID NO: 7  
5' GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC-3' (degeneración 8): SEQ ID NO: 8  
5' GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC-3' (degeneración 8): SEQ ID NO: 9  
15 5' GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC-3' (degeneración 16): SEQ ID NO: 10  
5' GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC-3' (degeneración 12): SEQ ID NO: 11  
5' GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC-3' (degeneración 4): SEQ ID NO: 12  
5' GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC-3' (degeneración 4): SEQ ID NO: 13  
5' GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC-3' (degeneración 8): SEQ ID NO: 14  
20 5' GAY ATT STR ATG ACC CAR TC-3' (degeneración 16): SEQ ID NO: 15  
5' GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC-3' (degeneración 16): SEQ ID NO: 16  
5' GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC-3' (degeneración 12): SEQ ID NO: 17  
5' GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA-3' (degeneración 4): SEQ ID NO: 18  
5' GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT-3' (degeneración 4): SEQ ID NO: 19  
25 5' GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC-3' (degeneración 2): SEQ ID NO: 20  
5' GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC-3' (degeneración 2): SEQ ID NO: 21

antisentido de J (4 conjuntos de cebadores)

30 cebador antisentido de J1/J2 (1)

5'-GGG ACC AAR CTG GAA ATM AAA-3' (degeneración 8): SEQ ID NO: 22

35 cebador antisentido de J4 (2)

5'-GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA-3': SEQ ID NO: 23

cebador antisentido de J5 (3)

40 5'-GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA-3': SEQ ID NO: 24

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

45 (ii) 7 conjuntos de cebadores para la clonación de la región variable de la cadena L, VK sentido (parte del péptido señal)

Los cebadores se obtuvieron a través de modificación de la secuencia de nucleótidos de un conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen; Merck, n.º de Cat. 69831-3) de forma que se eliminaran los sitios de las enzimas de restricción. Cebador sentido del conjunto A

50 5'-ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT-3': SEQ ID NO: 25

Cebador sentido del conjunto B

55 5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3': SEQ ID NO: 26

Cebador sentido del conjunto C

60 5'-ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT-3': SEQ ID NO: 27

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

5'-ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT-3': SEQ ID NO: 28  
5'-ATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG-3': SEQ ID NO: 29

65

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

5'-ATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGS GTT-3': SEQ ID NO: 30  
 5'-ATGTGGGGAYCGKTTTYAMMCTTTTCAATTG-3': SEQ ID NO: 31  
 5'-ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3': SEQ ID NO: 32

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

5'-ATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG-3': SEQ ID NO: 33  
 5'-ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG-3': SEQ ID NO: 34  
 5'-ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCTTG-3': SEQ ID NO: 35  
 5'-ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT-3': SEQ ID NO: 36

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

5'-ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT-3': SEQ ID NO: 37  
 5'-ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT-3': SEQ ID NO: 38  
 5'-ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG-3': SEQ ID NO: 39  
 5'-ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG-3': SEQ ID NO: 40

Cebador antisentido de KVL

ACTGGATGGTGGGAAGATGGA: SEQ ID NO: 41

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

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

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

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

Estos cebadores se sintetizaron de acuerdo con Current Protocols in Immunology (John Wiley and Sons, Inc.), unidad 2.12 Cloning, Expression, and Modification of Antibody V Regions (tabla 2.12.2).

5'-ATG GRA TGS AGC TGK GTM ATS CTC TT-3' (degeneración: 32): SEQ ID NO: 42  
 5'-ATG RAC TTC GGG YTG AGC TKG GTT TT-3' (degeneración: 8): SEQ ID NO: 43  
 5'-ATG GCT GTC TTG GGG CTG CTC TTC T-3': SEQ ID NO: 44  
 5'-ATG GRC AGR CTT ACW TYY-3' (degeneración: 32): SEQ ID NO: 45

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

VH sentido (parte de FR1)

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

5'-SAG GTS MAR CTK SAG TCW GG-3'(degeneración: 256): SEQ ID NO: 46

VH antisentido (cebador antisentido común con 3 y 4)

El cebador se diseñó a través de degeneración de la secuencia de nucleótidos de forma que el cebador puede aparearse con todas las isoformas de la IgG de ratón.

5'-CAS CCC CAT CDG TCT ATC C-3'(degeneración: 6): SEQ ID NO: 47

## Ejemplo 5

Producción del vector de expresión de la inmunoglobulina anti CDH3 de quimera

## 5 Producción del plásmido de expresión

A través de PCR que emplea DNA Engine (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Bio-Rad), se amplificó cada región variable de la cadena L y la cadena H de un anticuerpo monoclonal de ratón anti CDH3, mediante el uso de los cebadores descritos en el Ejemplo 4. Cada uno de los fragmentos de ADN así amplificados se incorporó en el vector de subclonación pGEM (producto de Promega). La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN se determinó mediante el uso de un cebador universal que se une al promotor T7 y SP6 del vector. Las secuencias de nucleótidos así obtenidas de las regiones variables de la cadena L y cadena H del anticuerpo anti CDH3 se buscaron mediante la página IMGT/V-QUEST Search ([http://imgt.cines.fr/IMGT\\_vquest/vquest?livret=0&Option=mous elg](http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mous%20elg)), mediante lo cual se confirmó la finalización de la clonación de los genes del anticuerpo.

15 A continuación, un gen que codificaba la región CK humana se unió al gen clonado que codificaba la región V de la cadena L del anticuerpo anti CDH3, y un gen que codificaba la región Cy1 humana se unió al gen que codificaba la región V de la cadena H. Los genes del anticuerpo quimérico de la cadena L y la cadena H así diseñados se sintetizaron con su longitud completa mediante GenScript. En ese momento, se optimizó la frecuencia de uso de los codones para obtener una expresión génica eficaz en las células productoras (de acuerdo con un método divulgado en Kim *et al.*, Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells, *Gene*, 199, 1997, págs. 293-301). En concreto, en el caso de la cadena L, con el fin de una traducción eficaz, se yuxtapusieron, en este orden, una secuencia de ADN esencial (Kozak, M., J., At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196, págs. 947-950, 1987), el péptido señal de IGKV de ratón, la región V de la cadena L del anticuerpo anti CDH3 y la región CK humana, y se añadieron en ambos extremos sitios de enzimas de restricción (*NheI* en el lado 5' y *EcoRI* en el lado 3'). La cadena H de la quimera se preparó del mismo modo. Cada uno de los genes sintetizados se cortó con *NheI* y *EcoRI*, y el fragmento cortado se incorporó en el vector de expresión pCAGGS entre el sitio *NheI* y el sitio *EcoRI*, para producir de este modo un vector pCAGGS-IGK de expresión de la cadena L del anticuerpo quimérico anti CDH3 y el vector pCAGGS-IGH de expresión de la cadena H.

## Ejemplo 6: Producción de un vector de expresión estable de la inmunoglobulina anti CDH3 quimera

35 Para realizar la expresión de alto nivel de un gen de un anticuerpo genéticamente modificado en células CHO, se produjo un vector de expresión en el que se había incorporado el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr) unido a la secuencia del promotor de CMV y que tenía la señal de poli A.

Para producir una línea celular que produjera/expresara de forma estable el anticuerpo quimérico, se produjo un vector de expresión pCAGGS en el que se había incorporado el gen de dhfr. En concreto se incorporó en pCAGGS-IGH y pCAGGS-IGK, que son vectores de expresión transitoria, un gen dhfr que tenía un promotor de CMV y una señal poli A. Se amplificó a través de PCR cada uno de los genes dhfr de ratón que tenía un promotor de CMV y una secuencia de Kozak, y una señal de poli A de SV40. Estos genes en forma de mezcla se unieron entre sí a través de PCR y se añadió un sitio de *HindIII* en ambos extremos del producto unido, para adquirir de este modo un fragmento génico *HindIII*-promotor de CMV-Kozak-dhfr-poli A-*HindIII*. El fragmento se insertó en pCAGGS-IGH o pCAGGS-IGK en los sitios de *HindIII*, para obtener de este modo pCAGGS-IGH-CMVp-dhfr-A y pCAGGS-IGK-CMVp-dhfr-A. Estos vectores de expresión permiten la expresión del anticuerpo quimérico con un promotor CAG y la expresión de un gen dhfr con un promotor de CMV, mediante lo cual puede producirse de forma eficaz un anticuerpo quimérico a través de amplificación génica.

## 50 Ejemplo 7: Establecimiento de una línea celular CHO productora de anti CDH3 quimera

Se transformaron de forma simultánea células CHO dhfr (G. Urlaub *et al.*, Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, págs. 4216-4220, 1980) mediante el uso de dos plásmidos (plásmidos lineales obtenidos cortando plásmidos circulares con *PvuI* en un gen de resistencia a ampicilina); es decir, un vector pCAGGS-IGK-CMV-dhfr-A para la expresión de la cadena L de anti CDH3 quimera y un vector pCAGGS-IGH-CMV-dhfr-A para la expresión de la cadena H de anti CDH3 quimera. Se realizó electroporación mediante Amaxa (producto de Lonza). Se añadió el fragmento de ADN (2 µg/muestra; en el caso del plásmido de la cadena L o del plásmido de la H) a 0,1 ml de tampón de electroporación de CHO Amaxa que contenía  $3 \times 10^3$  células y se aplicó un pulso.

60 Las células que se había sometido a electroporación se añadieron a medio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM: sin HT) que contenía SFB dializado al 10 % sin HT (H: hipoxantina, T: timidina). Tres días después de la transfección, se cambió el medio a medio IMDM sin SFB dializado al 10 %, L-glutamina 2 mM y HT, y se seleccionaron las células transformadas neo+ mediante el uso de G418 1 mg/ml, para adquirir de este modo clones de una línea celular productora de anticuerpo quimérico positiva. Posteriormente, se realizó amplificación génica mediante el uso de los clones seleccionados utilizando G418. Se realizaron 2 ciclos de amplificación en metotrexato

(MTX) 250 nM y 1.000 nM, y se establecieron las líneas celulares que pueden producir un anticuerpo frente a CDH3 quimera (aproximadamente 50 a 100 mg/l de sobrenadante de cultivo). Las líneas celulares CHO que expresaban de forma estable anticuerpo anti CDH3 quimera así establecidas se depositaron en la Agencia Administrativa Incorporada, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depósito de Microorganismos de Patentes.

5

[Tabla 1]

Línea celular	N.º de referencia	Línea celular	N.º de referencia
PPAT-052-02c	NITE BP-1041	PPAT-052-25c	NITE BP-1046
PPAT-052-03c	NITE BP-1042	PPAT-052-26c	NITE BP-1047
PPAT-052-09c	NITE BP-1043	PPAT-052-27c	NITE BP-1048
PPAT-052-21c	NITE BP-1044	PPAT-052-28c	NITE BP-1049
PPAT-052-24c	NITE BP-1045	PPAT-052-29c	NITE BP-1050

Ejemplo 8: Adquisición de anticuerpos purificados

10 Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo mediante el uso de proteína A.

Ejemplo 9: Confirmación de la afinidad

15 A través de un método competitivo se comparó la afinidad del anticuerpo anti CDH3 de ratón con la del anticuerpo anti CDH3 quimera. En el método competitivo, la afinidad del anticuerpo anti CDH3 se determinó a través de citometría de flujo (BD, FACS Calibur), mediante el uso de células cancerosas NCI-H358, que son conocidas por ser células de alta expresión de CDH3.

20 En concreto, una muestra de anticuerpo diluido en serie (400 µg/ml a 24 ng/ml) (50 µl) y un anticuerpo marcado con Alexa488 (4 µg/ml) (50 µl) se añadieron a, y se mezclaron en una placa de 96 pocillos. Las células NCI-H358 se retiraron de la placa de cultivo a través del tratamiento con EDTA-PBS 2 mM y las células se suspendieron en una solución de FACS (PBS con BSA al 1 %) hasta una concentración de  $1,5 \times 10^6$ /ml. Se añadió a los pocillos que contenía la mezcla de anticuerpos una alícuota (100 µl) de la suspensión. Después de la adición, se realizó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos y la placa se lavó dos veces con solución de FACS (200 µl/pocillo). Posteriormente, se determinó a través de citometría de flujo la intensidad de fluorescencia (media GEO) de cada pocillo.

30 El porcentaje de inhibición de la unión del anticuerpo marcado con Alexa488 se calculó a partir del valor de la media GEO, en comparación con el obtenido con la reacción solo con el anticuerpo marcado con Alexa488 (1 µg/ml). Se calculó la concentración de anticuerpo que mostró el 50 % de inhibición y los datos se compararon.

La Fig. 1 muestra la evaluación de la afinidad de PPMX2016 (anticuerpo de ratón) y PPAT-052-27c (anticuerpo quimérico del mismo). No se observó prácticamente ninguna diferencia en la afinidad entre los dos anticuerpos.

35 Ejemplo 10: Producción de anticuerpos marcados

(1) Enlazamiento de DOTA al anticuerpo

40 Se disolvió el anticuerpo en un tampón (Bicina-NaOH 50 mM, NaCl 150 mM, pH: 8,5) hasta una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml. Por separado, se disolvió isotiocianobencil DOTA (B-205, producto de Macrocylics) en DMSO hasta una concentración de 10 mg/ml. Las dos soluciones se mezclaron entre para ajustar la proporción en moles del anticuerpo con respecto a DOTA a 1:1 (proporción de adición 1:1), 1:3 (proporción de adición 1:3) o 1:10 (proporción de adición 1:10), y la mezcla se agitó y se dejó reposar a 25 °C durante 17 horas. Tras la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se purificó por medio de una columna desaladora (PD-10, producto de GE Healthcare, 17-0435-01) con PBS. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: PPMX2016, PPMX2025, PPMX2029, PPAT-052-27c y PPAT-052-28c.

(2) Determinación del porcentaje de incorporación de quelato

50 El porcentaje de quelato incorporado en el anticuerpo se determinó a través de titulación quelatómica. La concentración de proteína de anticuerpo de modificación se determinó con antelación mediante un método habitual y la cantidad de moles del anticuerpo de modificación se calculó a partir del peso molecular de la IgG. Se añadieron a una solución de cobre patrón de 1 mg/ml (100 µl), cuya concentración se había determinado a través de espectrometría de absorción atómica, una solución (3 ml) de reactivo de arsenazo III (0,776 mg) y de acetato de amonio 5 M sin metales (producto de Sigma Aldrich), y se añadió agua ultrapura a la solución para ajustar el volumen final a 10 ml. La solución resultante se reservó a temperatura ambiente en oscuridad para preparar la solución de arsenazo III. El DOTA se disolvió en agua ultrapura, para preparar de este modo una solución de DOTA

55

patrón. Se disolvió el anticuerpo de modificación en agua ultrapura, para preparar de este modo una solución de anticuerpo de modificación. La solución de DOTA patrón o la solución de anticuerpo de modificación (10 µl) se combinaron con la solución de arsenazo III (190 µl), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda 630 nM. A partir de las mediciones de absorbancia de las soluciones de DOTA patrón se extrajo una curva patrón. Mediante la curva patrón, se calculó la cantidad de moléculas de DOTA enlazadas al anticuerpo de modificación (número promedio de modificación DOTA).

La tabla 2 muestra los resultados (la proporción de adición de DOTA y el número promedio real de DOTA de modificación). Como está claro a partir de la Tabla 2, se encontró que la cantidad de moléculas de DOTA enlazadas al anticuerpo está determinada por lo proporción de adición de DOTA.

[Tabla 2]

Proporción de adición de anticuerpo con respecto a DOTA	N.º prom. de DOTA de modificación
PPMX2025 (proporción de adición 1:1)	0,9
PPMX2025 (proporción de adición 1:3)	2,0
PPMX2025 (proporción de adición 1:10)	5,3
PPMX2016 (proporción de adición 1:1)	0,7
PPMX2016 (proporción de adición 1:3)	2,1
PPMX2016 (proporción de adición 1:10)	5,2
PPAT-052-27c (proporción de adición 1:3)	1,8
(Nota) PPAT-052-27c se analizó solo a una proporción de adición de 1:3.	

(3) Preparación de anticuerpos marcados con  $^{67}\text{Ga}$ -,  $^{111}\text{In}$ - o  $^{90}\text{Y}$

(i) Marcaje con  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{111}\text{In}$

Cada uno de los anticuerpos purificados PPMX2016, PPMX2025, PPMX2029 y PPAT-052-27c, y el anticuerpo PPAT-052-28c, se disolvió en un tampón (acetato de amonio-HCl 0,25 M, pH: 5,5) hasta una concentración de 6 mg/ml. Se añadió una solución de  $^{67}\text{GaCl}_3$  (producto de Fuji Film RI Pharma) o una solución de  $^{111}\text{InCl}_3$  (producto de MDS Nordion Inc.) a la solución de anticuerpo y la mezcla se incubó a 45 °C durante una hora.

(ii) Marcaje con  $^{90}\text{Y}$

Se disolvió cada uno de los anticuerpos PPMX2029 y PPAT-052-27c purificados en un tampón (acetato de amonio-HCl 0,25 M, pH: 5,5) hasta una concentración de 6 mg/ml. Se añadió una solución de  $^{90}\text{YCl}_3$  (producto de Nuclitec) a la solución de anticuerpo y la mezcla se incubó a 45 °C durante una hora.

(iii) Determinación del porcentaje de marcaje

Se tomó una muestra de una alícuota de la mezcla de reacción de marcaje y se sometió a cromatografía en capa fina (61885, producto de PALL), para determinar de este modo el porcentaje de marcaje. Se empleó solución salina fisiológica como eluyente y se midió la radioactividad en los extremos de la parte superior e inferior de una tira mediante un contador γ. El porcentaje de marcaje se calculó mediante la siguiente ecuación.

[E1]

$$\text{Porcentaje de marcaje} = (\text{cuentas del extremo de la parte inferior} / (\text{cuentas del extremo de la parte superior} + \text{cuentas del extremo de la parte inferior})) \times 100 (\%)$$

Cuando el porcentaje de marcaje alcanzó el 90 % o más, el anticuerpo marcado se utilizó en los experimentos posteriores. Los anticuerpos marcados se purificaron en una columna desaladora (PD-10, producto de GE Healthcare, 17-0435-01) con PBS.

Ejemplo 11: Investigación de la relación entre el porcentaje de incorporación de quelato y la biodistribución (es decir, distribución en el cuerpo)

Se investigaron PPMX2016, PPMX2025 y PPMX2029 en términos de biodistribución en virtud de la diferencia de los valores del porcentaje de incorporación de quelato (proporción de adición de DOTA de 1:1, 1:3 y 1:10).

En primer lugar, se cultivó NCI-H358 en medio RPMI1640 conteniendo SFB al 10 % y las células cultivadas se trasplantaron por vía subcutánea a la región ventral derecha de cada uno de los ratones desnudos (hembras, de 7

semanas, CLEA Japón Inc.) a una concentración de células  $1 \times 10^7$  células/por ratón. Los ratones se criaron hasta que se alcanzó un volumen tumoral promedio de 100 a 150 mm<sup>3</sup>.

Después, se les administró a los ratones trasplantados con NCI-H358 el anticuerpo <sup>67</sup>Ga-DOTA-PPMX2016 (proporción de adición 1:3 y 1:10), el anticuerpo <sup>67</sup>Ga-DOTA-PPMX2025 (proporción de adición 1:3 y 1:10) o anticuerpo <sup>67</sup>Ga-DOTA-PPMX2029 (proporción de adición 1:3 y 1:10) a una dosis de 370 kBq/por ratón.

Noventa y seis horas después de la administración, los ratones se sacrificaron para las características anatómicas y se extrajeron tejidos y el tumor. Se midieron el peso de cada uno de los tejidos y el peso del tumor, se midió la radioactividad por medio de un contador y se calculó el % de DI/g mediante la siguiente ecuación.

[E2]

$$\% \text{ de DI/g} = \frac{\text{cantidad de IR acumulada}}{\text{cantidad de IR administrada total} \times 100 (\%)} / \text{peso (g)}$$

Las Figs. 2 a 7 muestran los resultados. Todos los anticuerpos analizados presentaron una acumulación potenciada en el tumor a una proporción de adición de DOTA de 1:3, en comparación con el caso de una proporción de 1:10. Tal acumulación potenciada da como resultado la potenciación del efecto terapéutico. Además, pueden evitarse los efectos secundarios adversos, que de otra forma se observarían, provocados por la retención de una sustancia radioactiva en los órganos que no son el objetivo.

La Fig. 8 muestra el resultado de la administración del anticuerpo <sup>67</sup>Ga-DOTA-PPMX2025 (proporción de uso 1:1, 1:3 y 1:10) a ratones desnudos no portadores de cáncer (hembras, de 7 semanas, CLEA Japón Inc.) a 370 kBq/por ratón. El anticuerpo se acumuló de forma elevada en el hígado cuando la proporción de adición fue de 1:10, mientras que la acumulación en el hígado fue baja cuando la proporción fue de 1:3 o 1:1, lo que indica que se previenen en el hígado los efectos secundarios adversos, tal como daño por radioactivo.

Ejemplo 12: Investigación del comportamiento del anticuerpo quimérico anti caldina en el cuerpo

Se investigaron los comportamientos en el cuerpo de los anticuerpos quimera PPAT-052-27c y PPAT-052-28c.

En primer lugar, se cultivaron NCI-H1373 en medio RPMI1640 conteniendo SFB al 10 % y las células cultivadas se trasplantaron por vía subcutánea en la región ventral derecha de cada uno de los ratones desnudos (hembras, de 9 semanas, CLEA Japón Inc.), a una concentración de células  $4 \times 10^6$  células/por ratón. Los ratones se criaron hasta que el volumen tumoral promedio alcanzó los 100 a 150 mm<sup>3</sup>.

Después, a los ratones trasplantados con NCI-H1373 se les administró <sup>111</sup>In-DOTA-PPAT-052-27c (proporción de adición 1:3) o <sup>111</sup>In-DOTA-PPAT-052-28c (proporción de adición de 1:3) a una dosis de 370 kBq/por ratón.

Cuarenta y ocho o noventa y seis horas después de la administración se sacrificaron los ratones para anatomía y se extrajeron tejidos y el tumor. Se midieron el peso de cada uno de los tejidos y el peso del tumor, se midió la radioactividad mediante un contador y se calculó el % de DI/g.

Las Figs. 9 a 11 muestran los resultados. PPAT-052-27c presentó una acumulación porcentual en el tumor tan alta como el 46 % de DI/g 48 horas después de la administración. PPAT-052-28c se presentó una acumulación porcentual en el tumor tan alta como el 41 % de DI/g 48 horas después de la administración y 52 % de DI/g 96 horas después de la administración.

Ejemplo 13: Prueba de xenoinjerto

Se cultivaron NCI-H358 en medio RPMI1640 conteniendo SFB al 10 % y las células cultivadas se trasplantaron por vía subcutánea en la región ventral derecha de cada uno de los ratones desnudos (hembras, de 7 semanas, CLEA Japón Inc.) a una concentración de células  $1 \times 10^6$  células/por ratón.

Los ratones trasplantados con NCI-H358 se dividieron en seis grupos (n = 8). Se administró anticuerpo <sup>90</sup>Y-DOTA-PPMX2029 (proporción de adición 1:3) a una dosis de 7,4 MBq/por ratón, 5,6 MBq/por ratón, 3,7 MBq/por ratón y 1,9 MBq/por ratón. Como grupos de control, se administró PPMX2029 sin marcar a una dosis de 80 µg/por ratón y se administró solución salina fisiológica a una dosis de 100 µl/por ratón. En todos los grupos se realizó la administración cuando el volumen tumoral porcentual alcanzó los 100 a 150 mm<sup>3</sup>.

Después de la administración, se midieron el peso corporal y el volumen tumoral dos veces por semana (cada 3 o 4 días). Esta observación se continuó hasta el día 51 después de la administración.

La Fig. 12 muestra los resultados de la prueba. El anticuerpo <sup>90</sup>Y-DOTA-PPMX2029 (proporción de adición 1:3) presentó un efecto antitumoral proporcional a la radioactividad.



Por separado se cultivaron NCI-H1373 en medio RPMI1640 conteniendo SFB al 10 % FBS y las células cultivadas se trasplantaron por vía subcutánea en la región ventral derecha de cada uno de los ratones desnudos (hembras, de 7 semanas, CLEA Japón Inc.) a una concentración de células de  $5 \times 10^6$  células/por ratón.

5 Los ratones trasplantados con NCI-H1373 se dividieron en cuatro grupos ( $n = 8$ ). Se administró anticuerpo  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-PPAT-052-27c (proporción de adición 1:3) a una dosis de 5,6 MBq/por ratón y 3,7 MBq/por ratón. Como grupos de control, se administró PPMX2029 no marcado a una dosis de 60  $\mu\text{g}$ /por ratón y se administró solución salina fisiológica a una dosis de 100  $\mu\text{l}$ /por ratón. En todos los grupos se realizó la administración cuando el volumen tumoral promedio alcanzó los 100 a 150  $\text{mm}^3$ .

10 Después de la administración se midieron el peso corporal y el volumen tumoral dos veces por semana (cada 3 o 4 días). Esta observación se continuó hasta el día 26 después de la administración.

15 La Fig. 13 muestra los resultados de la prueba.  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-PPAT-052-27c (proporción de adición de 1:3) presentó un efecto antitumoral proporcional a la radioactividad.

#### Ejemplo 14: Tinción inmunohistoquímica

20 Se confirmó la expresión de la proteína CDH3 en una muestra de ensayo clínica de cáncer mediante tinción inmunohistoquímica de una matriz de tejidos de muestras de ensayo de cáncer.

Como matrices de tejido de muestra de ensayo de cáncer, se emplearon tejidos de cáncer pancreático (adenocarcinoma), cáncer de pulmón (adenocarcinoma), cáncer de pulmón (carcinoma de células escamosas) y cáncer colorrectal (adenocarcinoma), que son productos de Shanghai Outdo Biotech Co., Ltd.

25 Se le retiró la cera a cada portaobjeto de las matrices de tejidos y se activó con Tris 10 mM EDTA 1 mM (pH: 9,0) a 95 °C durante 40 minutos. Se inactivó la peroxidasa endógena en el portaobjetos de la matriz con un agente bloqueante, el cual está incluido en el ENVISION+Kit (producto de Dako). Posteriormente, el portaobjetos de la matriz de tejido se hizo reaccionar con anticuerpo anti CDH3 610227 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (producto de BD BIOSCIENCE) o con anticuerpo anti HBs Hyb-3423 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (control negativo) a 4 °C durante una noche. Se lavó la solución de anticuerpo y el portaobjeto de la matriz de tejido se hizo reaccionar adicionalmente con un reactivo de anticuerpo secundario polimérico que está incluido en el ENVISION+Kit a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se reveló por color el portaobjetos mediante un reactivo colorante que está incluido en el ENVISION+Kit, y se realizó tinción nuclear mediante el uso de una solución de hematoxilina/eosina.

35 La Fig. 14 muestra los resultados. El anticuerpo anti CDH3 tiñó las células cancerosas pero no tiñó las células normales.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> FUJIFILM RI Pharma Co., Ltd.:Perseus Proteomics Inc.  
 <120> Anticuerpo anti cadherina marcado con un metal radioactivo

45 <130> PER0021

<150> JP 2010-028028  
 <151> 10-02-2010

50 <160> 47

<170> PatentIn versión 3.1

55 <210> 1  
 <211> 2490  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

60 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2490)  
 <223>

65 <400> 1

ES 2 656 168 T3

atg ggg ctc cct cgt gga cct ctc gcg tct ctc ctc ctt ctc cag gtt	48
Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val	
1 5 10 15	
tgc tgg ctg cag tgc gcg gcc tcc gag ccg tgc cgg gcg gtc ttc agg	96
Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg	
20 25 30	
gag gct gaa gtg acc ttg gag gcg gga ggc gcg gag cag gag ccc ggc	144
Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly	
35 40 45	
cag gcg ctg ggg aaa gta ttc atg ggc tgc cct ggg caa gag cca gct	192
Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala	
50 55 60	
ctg ttt agc act gat aat gat gac ttc act gtg cgg aat ggc gag aca	240
Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr	
65 70 75 80	
gtc cag gaa aga agg tca ctg aag gaa agg aat cca ttg aag atc ttc	288
Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe	
85 90 95	
cca tcc aaa cgt atc tta cga aga cac aag aga gat tgg gtg gtt gct	336
Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val Val Ala	
100 105 110	
cca ata tct gtc cct gaa aat ggc aag ggt ccc ttc ccc cag aga ctg	384
Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu	
115 120 125	
aat cag ctc aag tct aat aaa gat aga gac acc aag att ttc tac agc	432
Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser	
130 135 140	
atc acg ggg ccg ggg gca gac agc ccc cct gag ggt gtc ttc gct gta	480

ES 2 656 168 T3

Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val	
145	150 155 160
gag aag gag aca ggc tgg ttg ttg aat aag cca ctg gac cgg gag	528
Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu	
	165 170 175
gag att gcc aag tat gag ctc ttt ggc cac gct gtg tca gag aat ggt	576
Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly	
	180 185 190
gcc tca gtg gag gac ccc atg aac atc tcc atc atc gtg acc gac cag	624
Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln	
	195 200 205
aat gac cac aag ccc aag ttt acc cag gac acc ttc cga ggg agt gtc	672
Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val	
	210 215 220
tta gag gga gtc cta cca ggt act tct gtg atg cag gtg aca gcc acg	720
Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr	
	225 230 235 240
gat gag gat gat gcc atc tac acc tac aat ggg gtg gtt gct tac tcc	768
Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser	
	245 250 255
atc cat agc caa gaa cca aag gac cca cac gac ctc atg ttc acc att	816
Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile	
	260 265 270
cac cgg agc aca ggc acc atc agc gtc atc tcc agt ggc ctg gac cgg	864
His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg	
	275 280 285
gaa aaa gtc cct gag tac aca ctg acc atc cag gcc aca gac atg gat	912
Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp	
	290 295 300
ggg gac ggc tcc acc acc acg gca gtg gca gta gtg gag atc ctt gat	960
Gly Asp Gly Ser Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp	
	305 310 315 320
gcc aat gac aat gct ccc atg ttt gac ccc cag aag tac gag gcc cat	1008
Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His	
	325 330 335
gtg cct gag aat gca gtg ggc cat gag gtg cag agg ctg acg gtc act	1056
Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr	
	340 345 350
gat ctg gac gcc ccc aac tca cca gcg tgg cgt gcc acc tac ctt atc	1104
Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile	
	355 360 365
atg ggc ggt gac gac ggg gac cat ttt acc atc acc acc cac cct gag	1152
Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu	
	370 375 380
agc aac cag ggc atc ctg aca acc agg aag ggt ttg gat ttt gag gcc	1200
Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala	
	385 390 395 400

ES 2 656 168 T3

aaa aac cag cac acc ctg tac gtt gaa gtg acc aac gag gcc cct ttt	1248
Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe	
405 410 415	
gtg ctg aag ctc cca acc tcc aca gcc acc ata gtg gtc cac gtg gag	1296
Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu	
420 425 430	
gat gtg aat gag gca cct gtg ttt gtc cca ccc tcc aaa gtc gtt gag	1344
Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu	
435 440 445	
gtc cag gag ggc atc ccc act ggg gag cct gtg tgt gtc tac act gca	1392
Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala	
450 455 460	
gaa gac cct gac aag gag aat caa aag atc agc tac cgc atc ctg aga	1440
Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg	
465 470 475 480	
gac cca gca ggg tgg cta gcc atg gac cca gac agt ggg cag gtc aca	1488
Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr	
485 490 495	
gct gtg ggc acc ctc gac cgt gag gat gag cag ttt gtg agg aac aac	1536
Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn	
500 505 510	
atc tat gaa gtc atg gtc ttg gcc atg gac aat gga agc cct ccc acc	1584
Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr	
515 520 525	
act ggc acg gga acc ctt ctg cta aca ctg att gat gtc aat gac cat	1632
Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His	
530 535 540	
ggc cca gtc cct gag ccc cgt cag atc acc atc tgc aac caa agc cct	1680
Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro	
545 550 555 560	
gtg cgc cag gtg ctg aac atc acg gac aag gac ctg tct ccc cac acc	1728
Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr	
565 570 575	
tcc cct ttc cag gcc cag ctc aca gat gac tca gac atc tac tgg acg	1776
Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr	
580 585 590	
gca gag gtc aac gag gaa ggt gac aca gtg gtc ttg tcc ctg aag aag	1824
Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys	
595 600 605	
ttc ctg aag cag gat aca tat gac gtg cac ctt tct ctg tct gac cat	1872
Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His	
610 615 620	
ggc aac aaa gag cag ctg acg gtg atc agg gcc act gtg tgc gac tgc	1920
Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys	
625 630 635 640	
cat ggc cat gtc gaa acc tgc cct gga ccc tgg aag gga ggt ttc atc	1968
His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile	
645 650 655	

ES 2 656 168 T3

ctc cct gtg ctg ggg gct gtc ctg gct ctg ctg ttc ctc ctg ctg gtg 2016  
 Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Leu Val  
 660 665 670

ctg ctt ttg ttg gtg aga aag aag cgg aag atc aag gag ccc ctc cta 2064  
 Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu  
 675 680 685

ctc cca gaa gat gac acc cgt gac aac gtc ttc tac tat ggc gaa gag 2112  
 Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu  
 690 695 700

ggg ggt ggc gaa gag gac cag gac tat gac atc acc cag ctc cac cga 2160  
 Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg  
 705 710 715 720

ggt ctg gag gcc agg ccg gag gtg gtt ctc cgc aat gac gtg gca cca 2208  
 Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro  
 725 730 735

acc atc atc ccg aca ccc atg tac cgt cct cgg cca gcc aac cca gat 2256  
 Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp  
 740 745 750

gaa atc ggc aac ttt ata att gag aac ctg aag gcg gct aac aca gac 2304  
 Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp  
 755 760 765

ccc aca gcc ccg ccc tac gac acc ctc ttg gtg ttc gac tat gag ggc 2352  
 Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly  
 770 775 780

agc ggc tcc gac gcc gcg tcc ctg agc tcc ctc acc tcc tcc gcc tcc 2400  
 Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser  
 785 790 795 800

gac caa gac caa gat tac gat tat ctg aac gag tgg ggc agc cgc ttc 2448  
 Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe  
 805 810 815

aag aag ctg gca gac atg tac ggt ggc ggg gag gac gac tag 2490  
 Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp  
 820 825

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

5

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

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

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

ES 2 656 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 656 168 T3

290						295										300
Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Leu	Asp	
305					310					315					320	
Ala	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Met	Phe	Asp	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ala	His	
				325					330					335		
Val	Pro	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	His	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr	
			340					345					350			
Asp	Leu	Asp	Ala	Pro	Asn	Ser	Pro	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ile	
		355					360					365				
Met	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	His	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	His	Pro	Glu	
	370					375						380				
Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	
385					390					395					400	
Lys	Asn	Gln	His	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Pro	Phe	
				405					410					415		
Val	Leu	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Val	His	Val	Glu	
			420					425					430			
Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Val	Glu	
		435					440					445				
Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Val	Cys	Val	Tyr	Thr	Ala	
	450					455					460					
Glu	Asp	Pro	Asp	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	
465					470					475					480	
Asp	Pro	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Met	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Thr	
				485					490					495		
Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Val	Arg	Asn	Asn	
			500					505					510			
Ile	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Leu	Ala	Met	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr	
		515					520					525				
Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asp	His	
	530					535					540					

ES 2 656 168 T3

Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro  
 545 550 555 560  
  
 Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr  
 565 570 575  
  
 Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr  
 580 585 590  
  
 Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys  
 595 600 605  
  
 Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His  
 610 615 620  
  
 Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys  
 625 630 635 640  
  
 His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile  
 645 650 655  
  
 Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Val  
 660 665 670  
  
 Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu  
 675 680 685  
  
 Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu  
 690 695 700  
  
 Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg  
 705 710 715 720  
  
 Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro  
 725 730 735  
  
 Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp  
 740 745 750  
  
 Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp  
 755 760 765  
  
 Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly  
 770 775 780  
  
 Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser  
 785 790 795 800



ES 2 656 168 T3

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

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

5 <210> 3  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> ADN diseñado a base del gen de CDH3

<400> 3  
cgcggtacca tggggctccc tcgt 24

15 <210> 4  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> ADN diseñado a base del gen de CDH3

<400> 4  
ccgtctagat aacctccctt ccagggtcc 29

25 <210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

35 <400> 5  
gayatccagc tgactcagcc 20

40 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

45 <400> 6  
gayattgttc tcwcccagtc 20

50 <210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

55 <400> 7  
gayattgmgm tmactcagtc 20

60 <210> 8  
<211> 20  
<212> ADN

## ES 2 656 168 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

5

<400> 8  
gayattgtgy tracacagtc 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

15

<400> 9  
gayattgtra tgacmcagtc 20

20

<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

30

<400> 10  
gayattmaga tramccagtc 20

35

<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

45

<400> 11  
gayattcaga tgaydcagtc 20

50

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

60

<400> 12  
gayatycaga tgacacagac 20

65

<210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

70

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

75

<400> 13  
gayattgttc tcawccagtc 20

80

<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN

## ES 2 656 168 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

5

<400> 14  
gayattgwgct saccacaatc 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

15

<400> 15  
gayattstra tgacccartc 20

20

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

30

<400> 16  
gayrtktgata gaccarac 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

40

<400> 17  
gayattgtgata gacbcagkc 20

<210> 18  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

50

<400> 18  
gayattgtgata taacycagga 20

<210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

60

<400> 19  
gayattgtgata gaccagwt 20

<210> 20  
<211> 20  
<212> ADN

65

## ES 2 656 168 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

5

<400> 20  
gayattgtga tgacacaacc 20

<210> 21  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

15

<400> 21  
gayattttgc tgactcagtc 20

20

<210> 22  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

30

<400> 22  
ggsaccaarc tggaaatmaa a 21

<210> 23  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

40

<400> 23  
gggacaaagt tggaaataaa a 21

<210> 24  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

50

<400> 24  
gggaccaagc tggagctgaa a 21

<210> 25  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

60

<400> 25  
atgragwcac akwcycaggt cttt 24

65

<210> 26  
<211> 25  
<212> ADN

# ES 2 656 168 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

5

<400> 26  
atggagacag acacactcct gctat 25

<210> 27  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

15

<400> 27  
atggagwcag acacactsct gytatgggt 29

20

<210> 28  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

30

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (27)..(27)  
<223> i

<400> 28  
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwtc tt 32

35

<210> 29  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

45

<400> 29  
atgggcwta agatragtc acakwyycwg g 31

<210> 30  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

55

<400> 30  
atgagtgtgc ycactcaggt cctgsgtt 29

<210> 31  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

65

<400> 31

atgtggggay cgktttyamm ctttcaatt g 31  
 <210> 32  
 <211> 28  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3  
 10  
 <400> 32  
 atggaagccc cagctcagct tctcttcc 28  
 <210> 33  
 <211> 26  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 25 <223> i  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 30 <223> i  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 35 <223> i  
 <400> 33  
 atgagnmmkt cnmttcantt cytggg 26  
 40 <210> 34  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 50 <223> i  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 55 <223> i  
 <400> 34  
 atgakgthcy cngctcagyt yctnrg 26  
 60 <210> 35  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>

## ES 2 656 168 T3

<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 35  
atggrtccw casctcagtt ccttg 25

5

<210> 36  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 36  
atgtatata gttgtgtc tatttct 27

15

<210> 37  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 37  
atgaagttgc ctgtaggct gttgtgct 29

25

<210> 38  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 38  
atggattwc argtcagat twtcagctt 29

35

<210> 39  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 39  
atggyctya tvtcctgct gttctgg 27

45

<210> 40  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 40  
atggyctya tvtrctgct gctatgg 27

55

<210> 41  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60

<220>

65

## ES 2 656 168 T3

<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 41  
actggatggt ggaagatgg a 21

5

<210> 42  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 42  
atggratgsa gctgkgtmat sctctt 26

15

<210> 43  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 43  
atgracttcg ggytgagctk ggtttt 26

25

<210> 44  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 44  
atggctgtct tgggctgct ctct 25

35

<210> 45  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 45  
atggrcagrc ttacwtyy 18

45

<210> 46  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 46  
saggtsmarc tksagsagtc wgg 23

55

<210> 47  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60

<220>

65



## ES 2 656 168 T3

<223> Cebador diseñado a base de un gen del anticuerpo anti CDH3

<400> 47

cascccatc dgtctatcc

19

5

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo, el cual se obtiene uniendo un elemento metálico radioactivo a un anticuerpo anti cadherina-P a través de un reactivo quelante de metales, donde el anticuerpo anti cadherina-P es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo recombinante producido por una célula productora de anticuerpos representada por el número de referencia NITE BP-897, NITE BP-899, NITE BP-1048, NITE BP-1049 o NITE BP-1050, o un fragmento de unión a cadherina-P de cualquiera de estos anticuerpos.
2. Un anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo, donde el anticuerpo anti cadherina P es un anticuerpo quimérico obtenido de un anticuerpo definido en la reivindicación 1 o un fragmento de unión a cadherina-P del mismo.
3. El anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el reactivo quelante de metales se selecciona del grupo que consiste en isotiocianobencil DOTA, metilisotiocianobencil DTPA y ciclohexilisotiocianobencil DTPA.
4. El anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proporción en moles del anticuerpo anti cadherina-P con respecto al reactivo quelante de metales es de 1 : 0,1 a 1 : 4,5, preferentemente de 1 : 0,5 a 1 : 3.
5. El anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el elemento metálico radioactivo es un metal radioactivo citotóxico utilizado en la terapia contra el cáncer, que puede seleccionarse del grupo que consiste en itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), hierro-59 ( $^{59}\text{Fe}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), oro-198 ( $^{198}\text{Au}$ ), disprosio-165 ( $^{165}\text{Dy}$ ), rutenio-103 ( $^{103}\text{Ru}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ) y lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), preferentemente es itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).
6. El anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo de acuerdo con la reivindicación 5, donde el anticuerpo está dirigido a un cáncer que expresa cadherina-P.
7. El anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el elemento metálico radioactivo es un metal radioactivo no citotóxico utilizado en el diagnóstico del cáncer, que puede seleccionarse del grupo que consiste en tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), indio-113m ( $^{113\text{m}}\text{In}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), cobalto-57 ( $^{57}\text{Co}$ ), estroncio-85 ( $^{85}\text{Sr}$ ) y cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), preferentemente el metal radioactivo no citotóxico se selecciona de indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ) y galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ).
8. Un agente terapéutico contra el cáncer que contiene, como un principio activo, el anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6.
9. Un agente diagnóstico para el cáncer que contiene, como un principio activo, el anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo como se indica en la reivindicación 7.
10. Una célula productora de anticuerpos que está depositada con el número de referencia NITE BP-897, NITE BP-899, NITE BP-1048, NITE BP-1049 o NITE BP-1050.
11. Uso del anticuerpo anti cadherina-P marcado con un metal radioactivo como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, para producir un agente terapéutico contra el cáncer, o como se indica en la reivindicación 7, para producir un agente de diagnóstico para el cáncer.
12. Un anticuerpo anti cadherina-P enlazado a DOTA, que se obtiene haciendo reaccionar un anticuerpo anti cadherina-P con isotiocianobencil DOTA, donde el anticuerpo anti cadherina-P es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo recombinante producido por una célula productora de anticuerpos representada por el número de referencia NITE BP-897, NITE BP-899, NITE BP-1048, NITE BP-1049 o NITE BP-1050, o un fragmento de unión a cadherina-P de cualquiera de estos anticuerpos.
13. Un anticuerpo anti cadherina-P enlazado a DOTA, donde el anticuerpo anti cadherina-P es un anticuerpo quimérico obtenido de un anticuerpo definido en la reivindicación 12.
14. El anticuerpo anti cadherina-P enlazado a DOTA de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, donde la proporción en moles del anticuerpo anti cadherina-P con respecto a DOTA es de 1 : 0,1 a 1 : 4,5, preferentemente de 1 : 0,5 a 1 : 3.
15. Un anticuerpo anti cadherina-P, el cual es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo recombinante producido por una célula productora de anticuerpos representada por el número de referencia NITE BP-897, NITE BP-899, NITE BP-1048, NITE BP-1049 o NITE BP-1050, o un fragmento de unión de cadherina-P de cualquiera de estos anticuerpos.

16. Un anticuerpo quimérico obtenido de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15 o un fragmento de unión a cadherina P del mismo.

Fig. 1

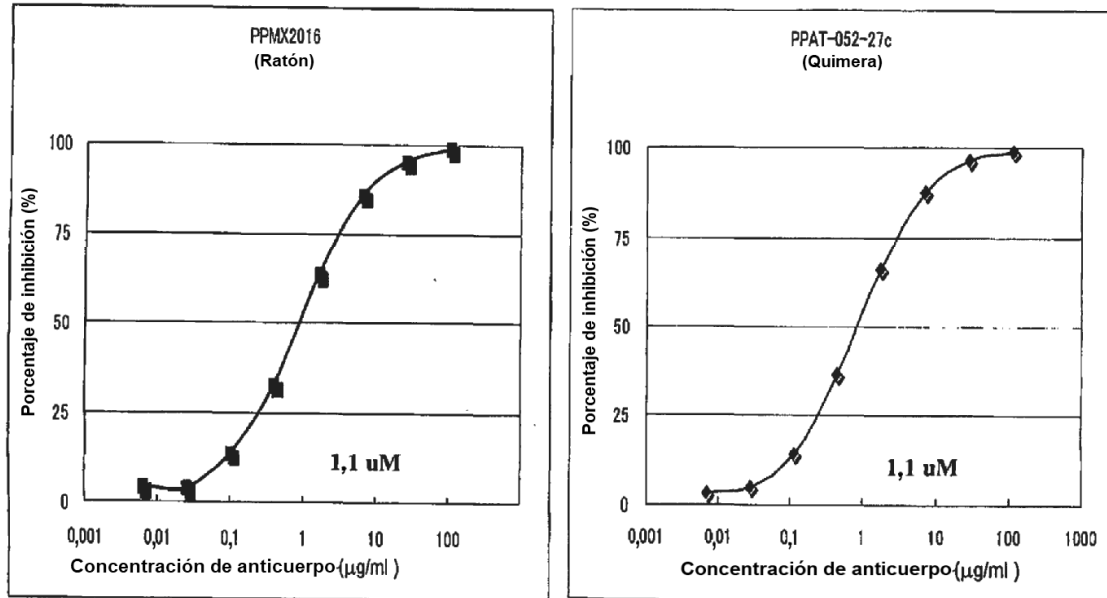


Fig. 2

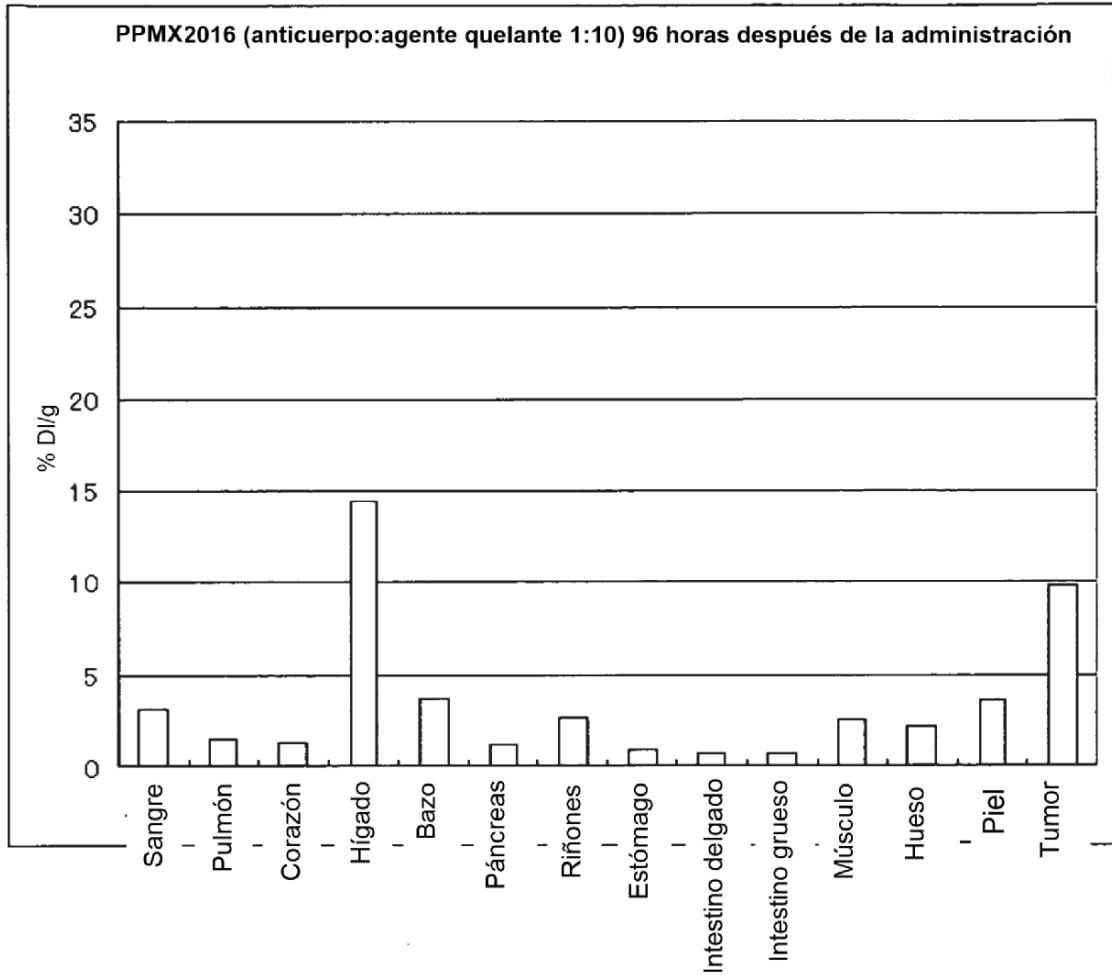


Fig. 3

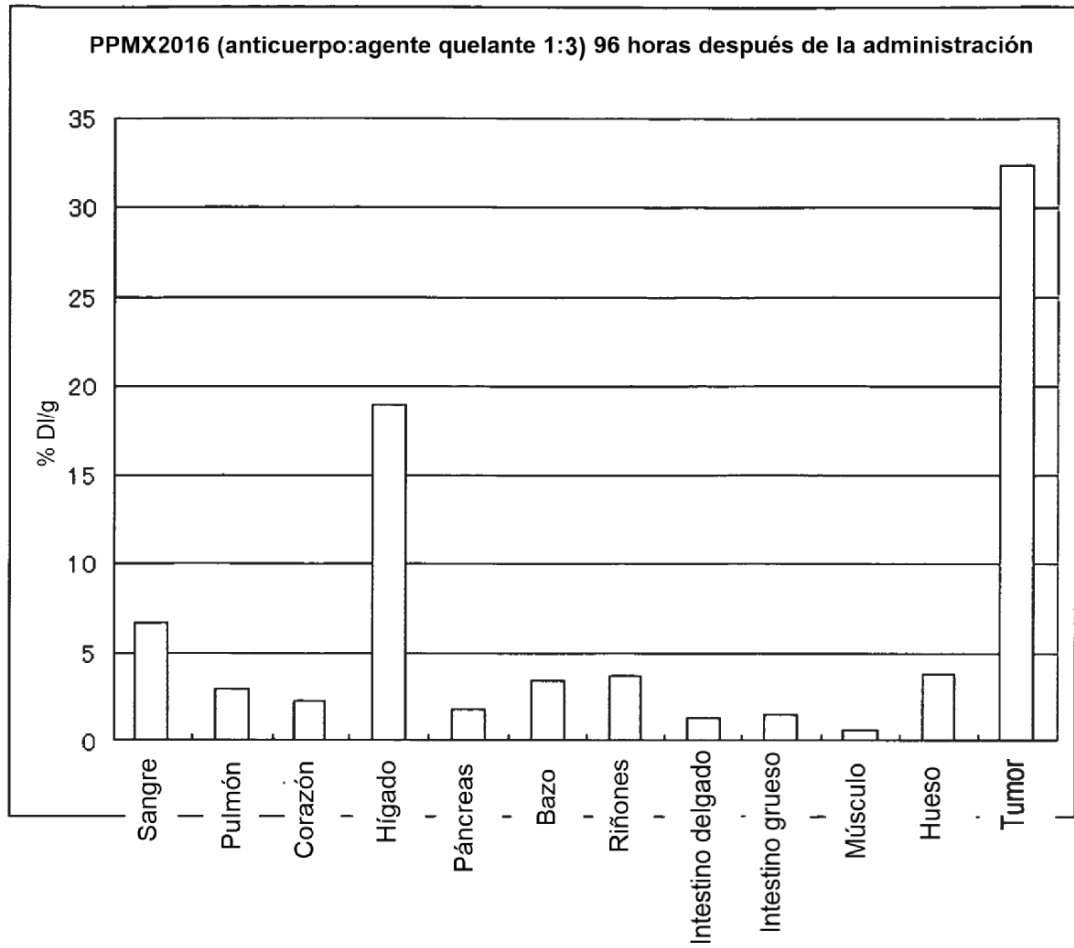


Fig. 4

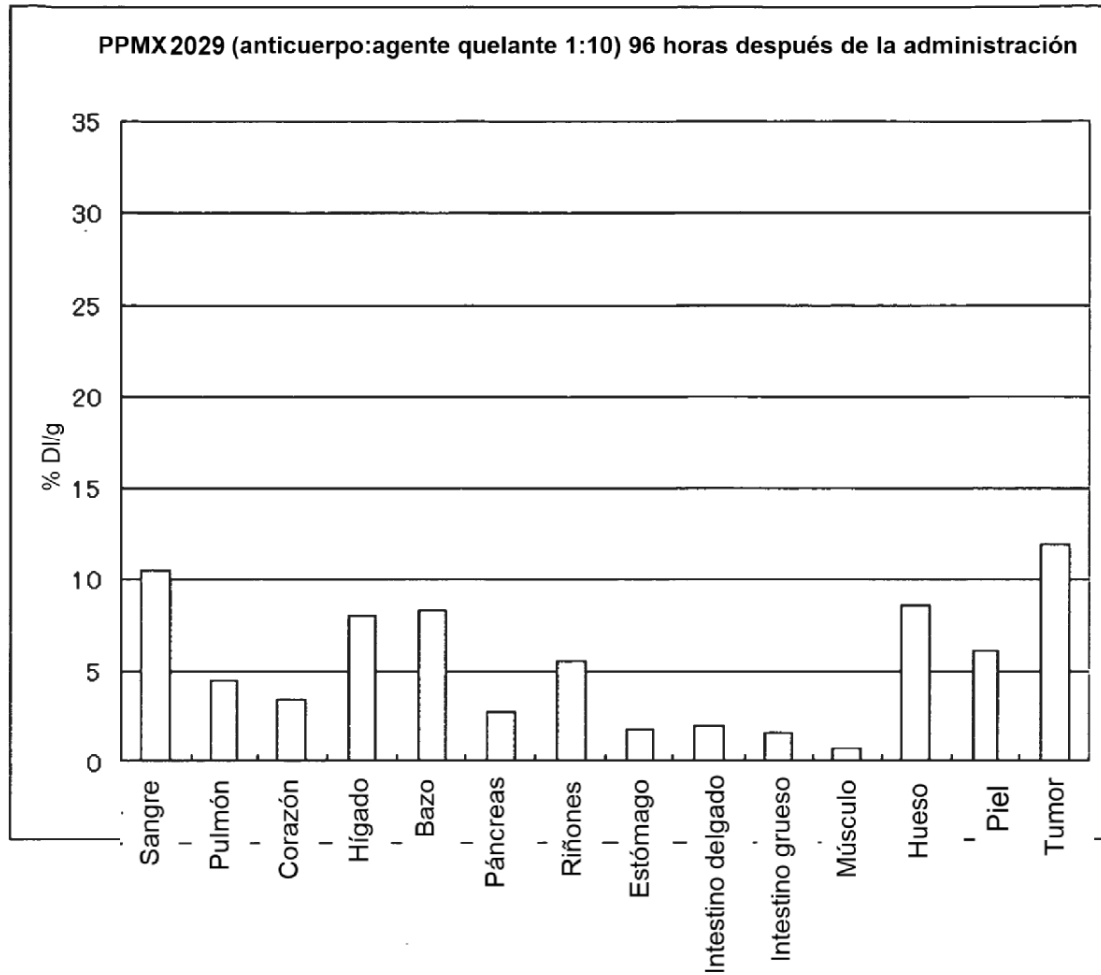


Fig. 5

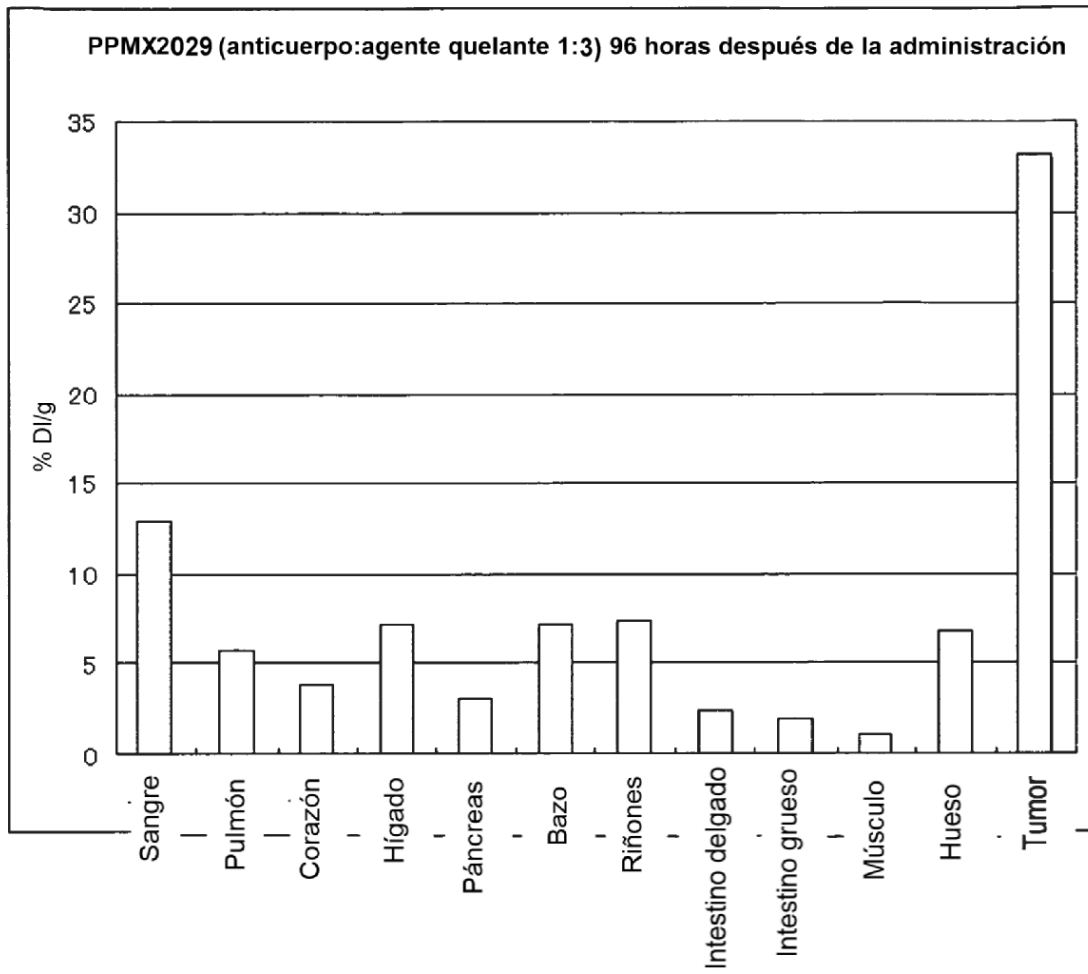




Fig. 6

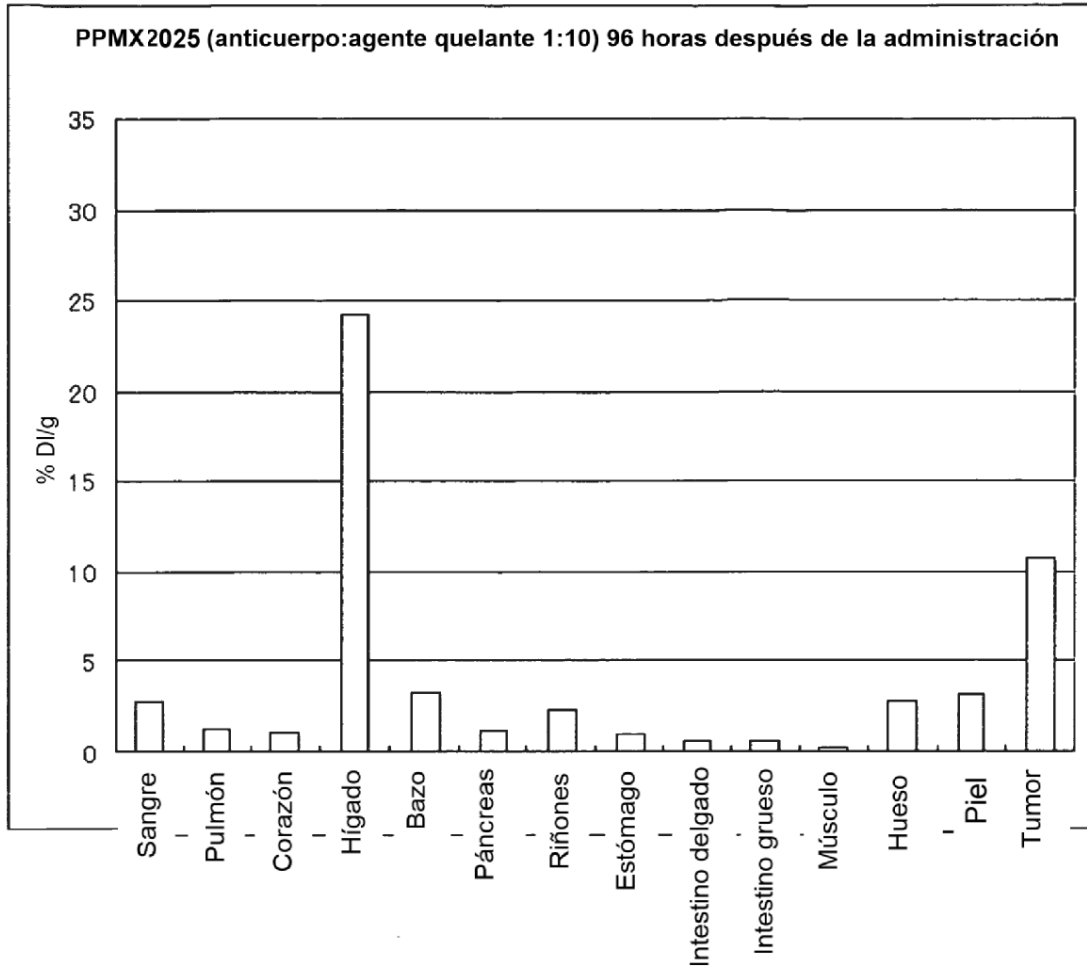


Fig. 7

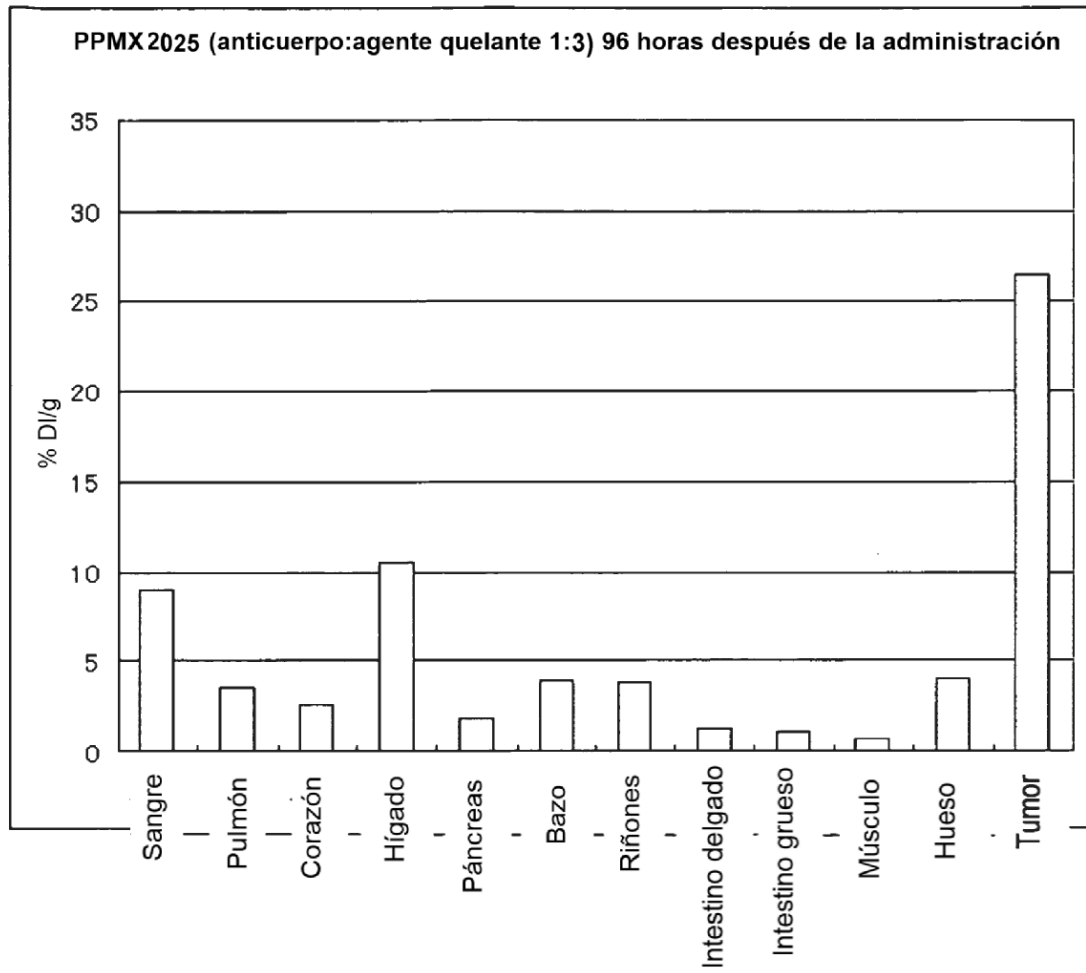


Fig. 8

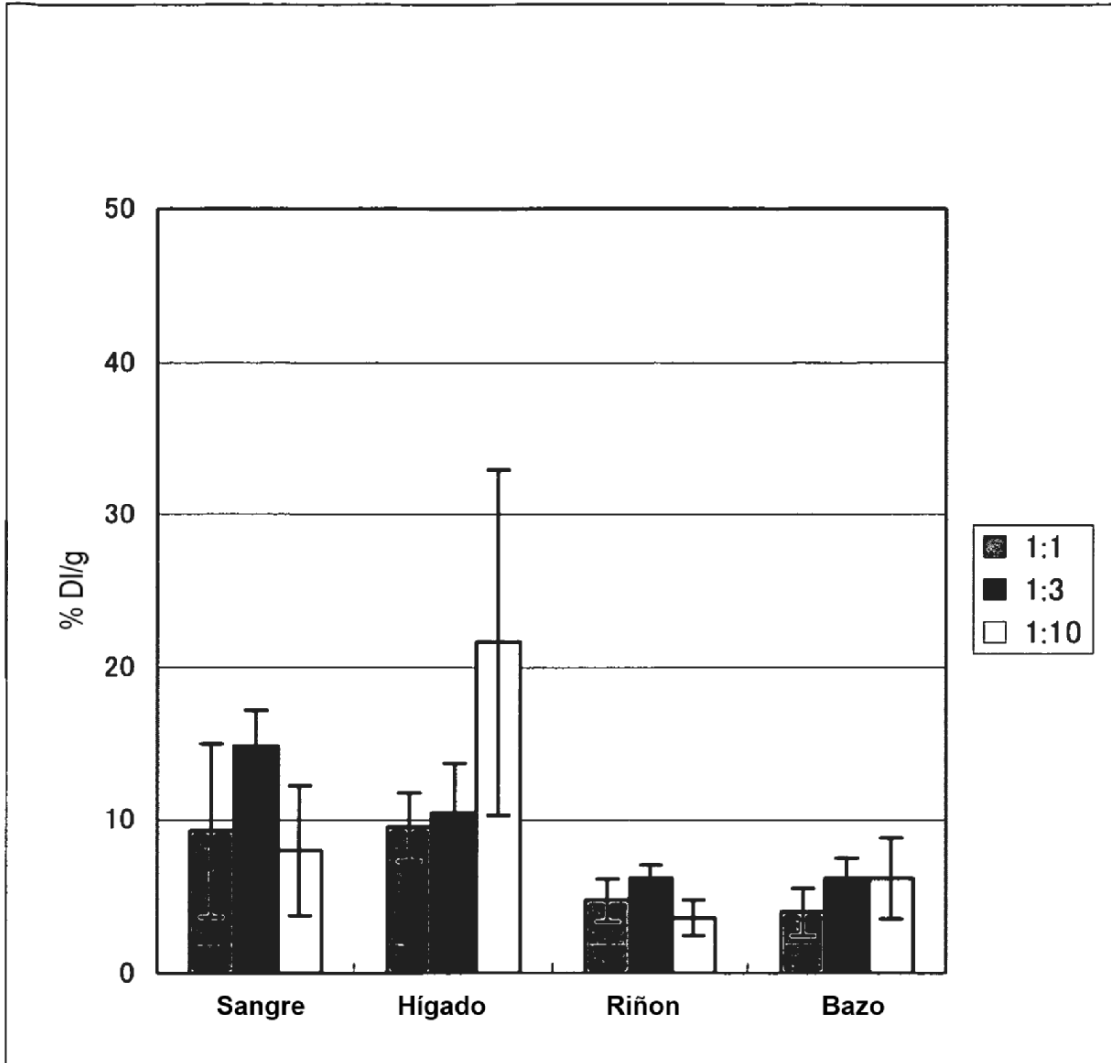


Fig. 9

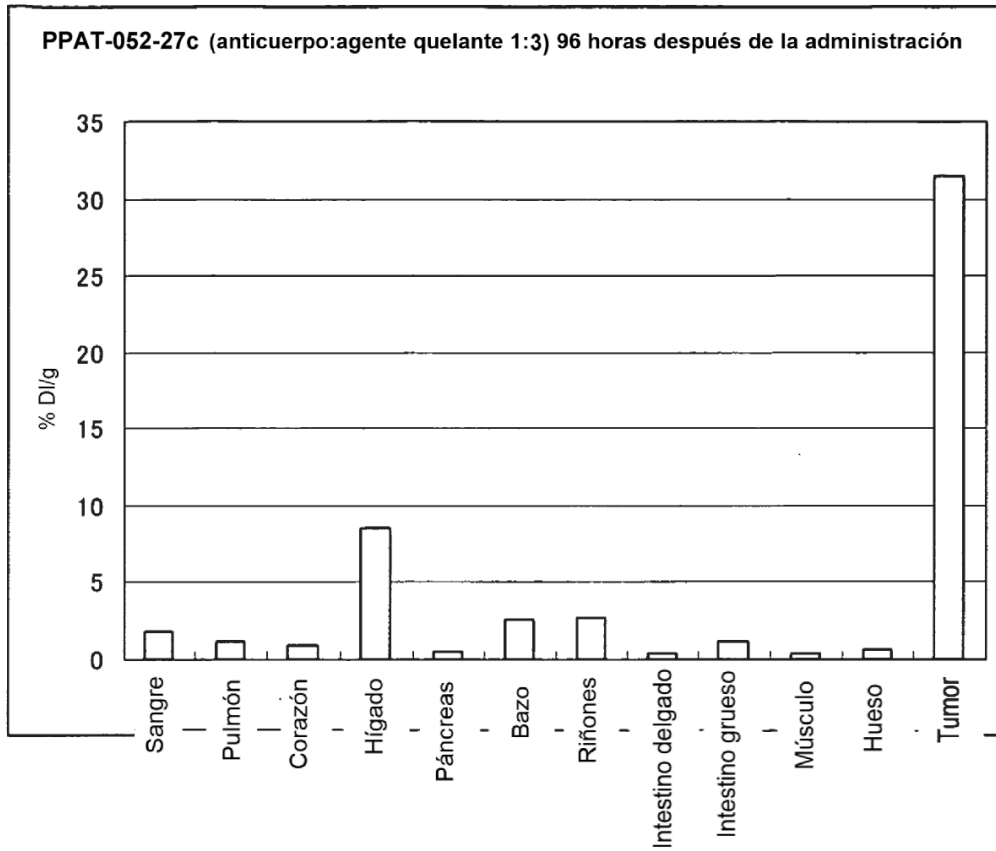


Fig. 10

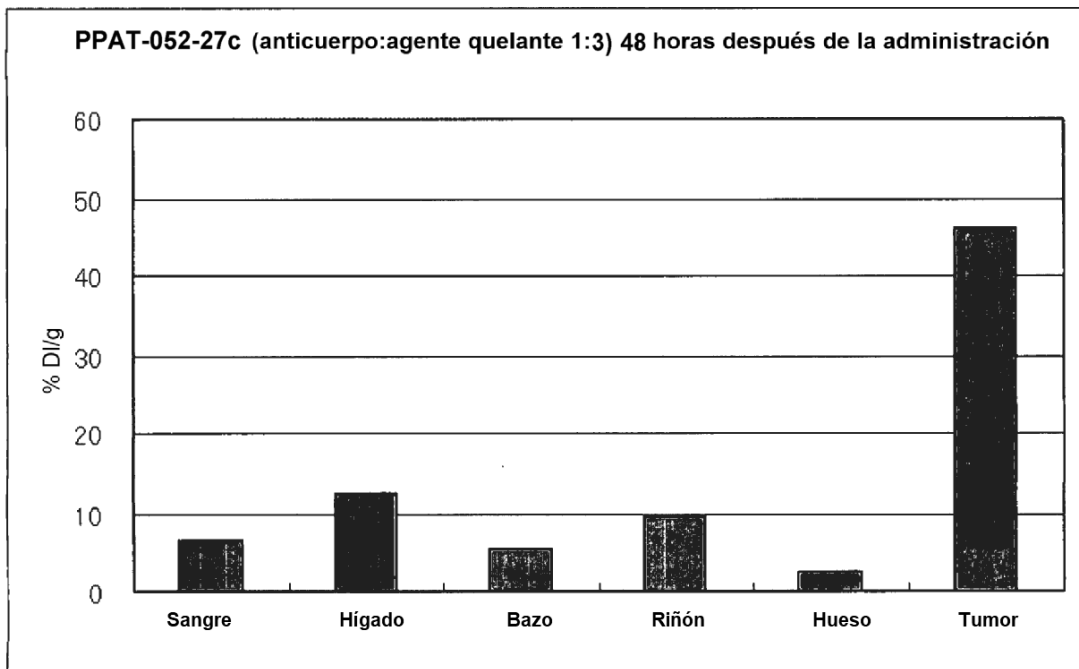


Fig. 11

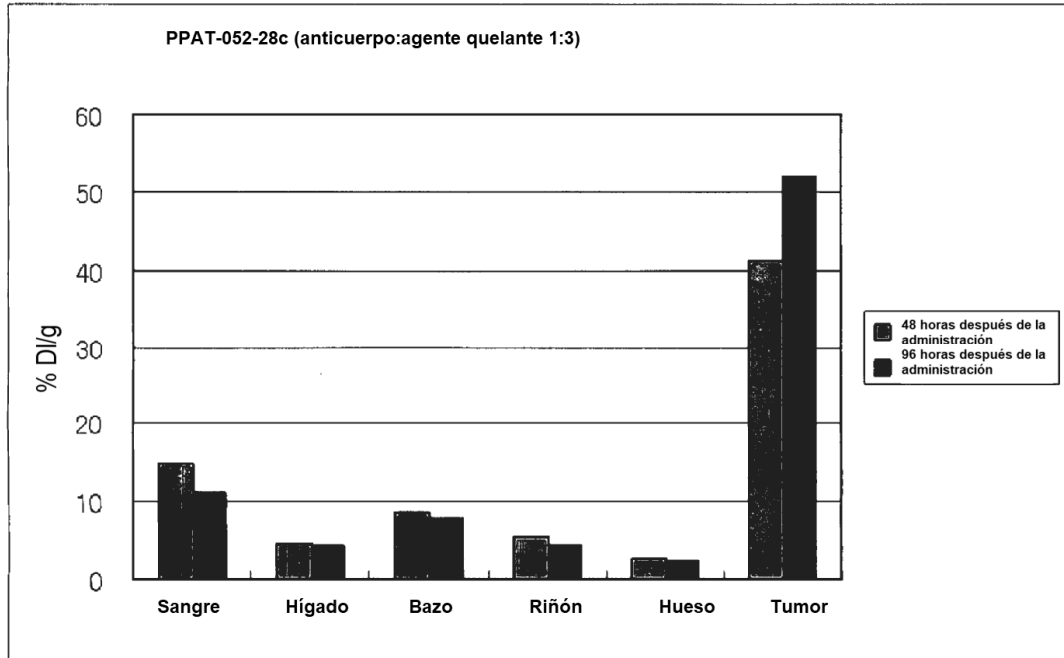


Fig.12

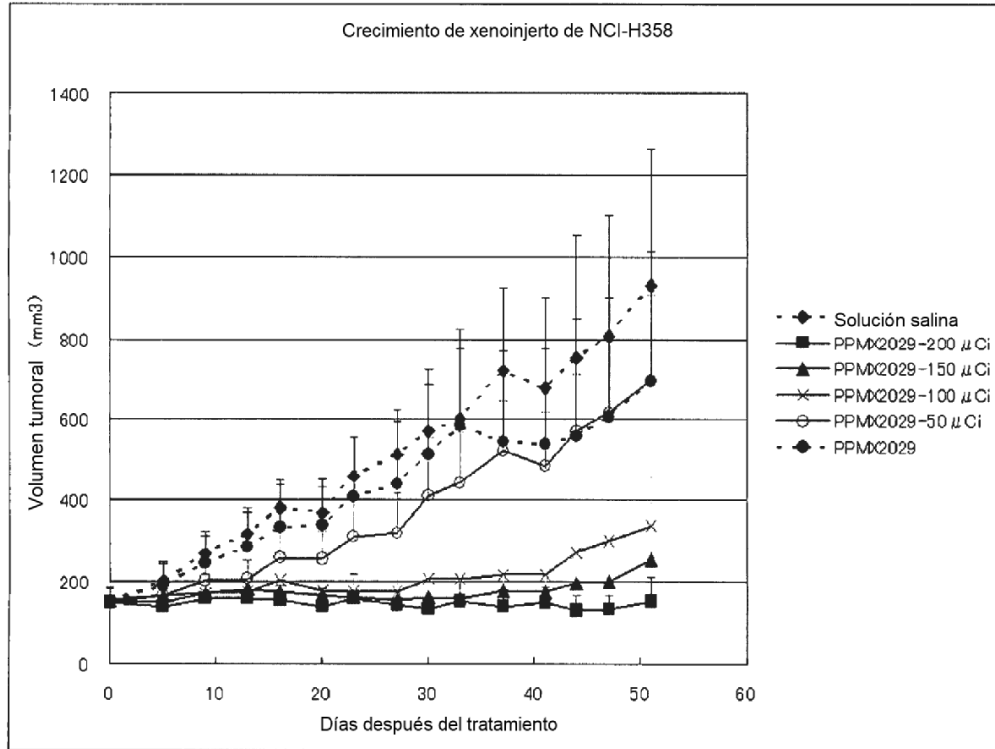


Fig. 13

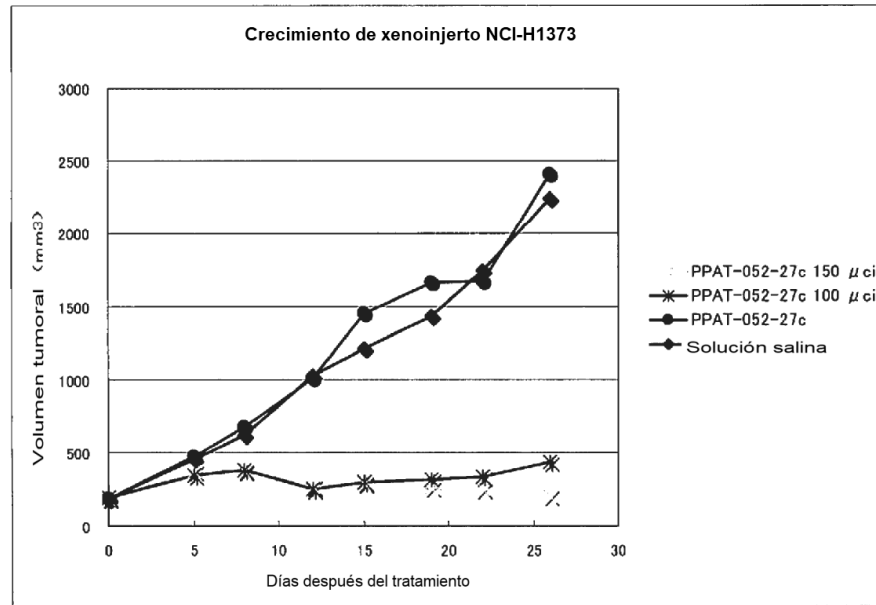




Fig. 14

