

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 692**

51 Int. Cl.:

A61K 51/10 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014 PCT/EP2014/070395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14772164 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 3049118**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti CD146**

30 Prioridad:
24.09.2013 DK 201370532

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2018

73 Titular/es:
**ONCOINVENT AS (100.0%)
Gullhaugveien 7
0484 Oslo, NO**

72 Inventor/es:
**BØNSDORFF, TINA BJØRNLUND y
LARSEN, ROY HARTVIG**

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 686 692 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 monoclonal anti CD146

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo anti CD146 (molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM) o glicoproteína de superficie celular MUC18) y derivados del mismo. El anticuerpo y/o sus derivados pueden utilizarse para terapia y/o para formación de imágenes, diagnóstico, y/o inmunotinción y/o inmunoeeliminación.

Antecedentes de la invención

El antígeno CD146 es un antígeno asociado a tumor interesante que podría utilizarse como diana en la terapia con anticuerpos.

CD146 (cúmulo de diferenciación 146), también conocido como molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM) o glicoproteína de superficie celular MUC18, es una molécula de adhesión celular de 113 kDa utilizada actualmente como un marcador de linaje de células endoteliales. En los seres humanos, la proteína CD146 está codificada por el gen *MCAM*.

La regulación al alza de este antígeno se describió por primera vez para células malignas de linaje melanocítico (Lehmann *et al.*, 1987) y más tarde se descubrió que era un marcador de progresión de la enfermedad en el melanoma maligno (Lehmann, *et al.*, 1989). Se encontró que la expresión de este antígeno está regulada al alza en varias formas de cáncer, incluyendo melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, mesotelioma, carcinoma pancreático, osteosarcoma y cáncer de pulmón (Sers *et al.*, 1994; Filshie, *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998; Kristiansen *et al.*, 2003; McGary *et al.*, 2003; Aldovini *et al.*, 2006; Bidlingmaier *et al.*, 2009). También se observa asociada con inflamación Middleton *et al.* 2005; Bardin *et al.*, 2006). En tejidos maduros normales, la expresión de CD146 se encuentra en células endoteliales, en células de músculo liso, en una subpoblación de linfocitos T activados y en trofoblastos intermedios (Pickl *et al.*, 1997; Shih *et al.*, 1996; Sers *et al.*, 1994). Por lo tanto, CD146 podría ser una diana para la terapia contra el cáncer.

El uso de los anticuerpos monoclonales ha aumentado constantemente desde su descubrimiento en la década de los setenta y en la actualidad es una industria multimillonaria. Se han desarrollado tratamientos basados en anticuerpos frente a varios antígenos asociados al cáncer, incluyendo Her-2 y CD20, y hoy en día los anticuerpos monoclonales constituyen una clase importante de agente terapéutico.

Los mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales en terapia dirigida son diversos. Algunos anticuerpos terapéuticos actúan deteniendo la proliferación de las células diana uniéndose al receptor antígeno diana en la superficie celular. Se han desarrollado otros anticuerpos monoclonales (quiméricos, humanizados, completamente humanos) para interactuar con efectores inmunitarios humanos (por ejemplo, factores del complemento, linfocitos citolíticos naturales) para estimular la destrucción de las células tumorales que se tienen como objetivo mediante estos efectores inmunitarios. Los anticuerpos monoclonales se pueden desarrollar adicionalmente como entidades de direccionamiento mediante conjugación con nanopartículas o micropartículas fabricadas de polímeros o proteínas, o cristales inorgánicos o una combinación de los mismos, que portan fármacos citotóxicos o moléculas radiactivas. Los anticuerpos monoclonales también pueden conjugarse de forma directa con fármacos (conjugados de anticuerpo y fármaco) (Sinha *et al.*, 2006, Peer *et al.*, 2007, Sievers y Senter, 2013).

En el pasado se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente al antígeno CD146 y el análisis *in vivo* e *in vitro* del direccionamiento con anticuerpos monoclonales anti CD146 ha mostrado una promesa considerable (McGary *et al.*, 2003; Melnikova *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2010). Aunque la función de CD146 no se comprende completamente, se ha demostrado que mediante la unión del anticuerpo se inhibe la función proliferativa y CD146 se ha descrito como un nuevo correceptor para VEGFR-2, y una diana prometedor para bloquear la angiogénesis relacionada con tumores (Jiang *et al.*, 2012). CD146 también se ha estudiado como un posible antígeno para la tecnología de inmunoliposomas de internalización dirigida (Iyer *et al.*, 2011).

Sumario de la invención

Un nuevo anticuerpo monoclonal, OI-3, y sus derivados, que se dirigen a un epítipo en CD146 con una amplia expresión en células tumorales de diversos orígenes.

El OI-3 muestra una unión específica significativa en células prebloqueadas con otros anticuerpos anti CD146 comerciales disponibles, lo que indica una exclusividad sustancial del epítipo con el que OI-3 se combina.

OI-3 también se distingue por la capacidad de unirse en conjunto a células, cortes de tejido congelados y muestras de tejido incluidas en parafina, lo que significa el direccionamiento a un epítipo versátil y robusto, comparado con

algunos de los anticuerpos para CD146 encontrados en la literatura (Zhang *et al.* 2008).

5 También muestra superioridad, con respecto a los bien conocidos anticuerpos dirigidos a CSPG4, en la unión a células que coexpresan CD146 y CSPG4, incluyendo melanoma, osteosarcoma y un cáncer de mama triple negativo.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que se une a CD146 humano y que es un anticuerpo monoclonal que está definido por una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, o un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítipo de CD146 humano que el anticuerpo definido en a) o que reconoce un epítipo que está cerca o se solapa con dicho epítipo, o un anticuerpo monoclonal que comparte al menos el 80 % de identidad de secuencia de combinación, con el epítipo con los anticuerpos definidos anteriormente.

15 En una realización de la presente invención, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal OI-3.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que se une a CD146 humano y que se obtiene de un anticuerpo monoclonal que está definido por una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, o de un anticuerpo no humano que reconoce el mismo epítipo de CD146 humano que el anticuerpo definido en a) o que reconoce un epítipo que está cerca o se solapa con dicho epítipo; en donde dicha molécula de anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

25 Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un radioinmunoconjugado que se une a CD146 humano que comprende un anticuerpo de la presente invención, a un enlazador y a un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ²¹¹At, ²¹³Bi, ²¹²Bi, ²¹²Pb, ²²⁵Ac, ²²⁷Th, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ¹⁹⁴Ir, ¹⁶⁶Ho, ¹⁵⁹Gd, ¹⁵³Sm, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴²Pr, ¹¹¹Ag, ¹⁰⁹Pd, ⁷⁷As, ⁶⁷Cu, ⁴⁷Sc, ²³⁰U, ²²⁶Th, ²²³Ra, ²²⁴Ra, ²²⁵Ra, ¹³¹I, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ⁹⁹mTc, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ¹⁶¹Tb y ¹⁷⁷Lu.

30 En una realización de la presente invención, el enlazador es un enlazador quelante.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable de un anticuerpo de la presente invención.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención o un fragmento funcional del mismo.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que porta uno o más vectores que comprenden una molécula de ADN de la presente invención.

40 En una realización de la presente invención, la célula es una línea de células de hibridoma.

45 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a CD146 de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de un anticuerpo como se describe en la presente invención, que comprende transfectar una célula hospedadora de mamífero con uno o más vectores de la presente invención, cultivar la célula hospedadora, y recuperar y purificar la molécula de anticuerpo.

55 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para tratar a un paciente que padece un cáncer, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo monoclonal de la presente invención o el radioinmunoconjugado de la presente invención, para el tratamiento del cáncer. En una realización del tratamiento del cáncer, el anticuerpo no marcado se administra antes de la radioinmunoterapia (RIT) o del conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), para reducir la unión al tejido normal del fármaco activo (RIT/ADC).

65 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto, que comprende; poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo monoclonal aislado de la presente invención o fragmento funcional del mismo, y detectar la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo, en donde un aumento significativo de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento

funcional del mismo a la muestra, en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento funcional del mismo a una muestra de control, diagnóstica al sujeto con cáncer.

5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit para la producción del radioinmunoconjugado de la presente invención que comprende dos o más viales, en donde un vial contiene un conjugado que comprende un quelante unido a un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de la presente invención; y un segundo vial que comprende un radionúclido.

10 Un aspecto adicional de la presente invención fue la observación inesperada de que la radioinmunoterapia utilizando OI-3 radiomarcado podía provocar una posterior regulación al alza de la unión de un anticuerpo que se dirige a un antígeno coexpresado, por ejemplo, Her-2. Se ha informado que la radiación con haz externo puede regular al alza la expresión de antígenos en células cancerosas (por ejemplo, Voutsas *et al.*, 2013). Sin embargo, los datos procedentes de la radioinmunoterapia experimental hasta ahora han indicado una expresión reducida con el uso de esta modalidad (Orbom *et al.*, 2013; Elgström *et al.*, 2012) o una respuesta mixta, con el ACE reducido, 15 manteniéndose sin cambios la queratina y el antígeno de membrana epitelial, y elevándose TAG-72 en tumores que resurgen 6 semanas después de la terapia (Esteban *et al.*, 1991). En otro estudio, sin embargo, (Schlom *et al.*, 1990) no se informó diferencia en TAG-72 entre tumores tratados y no tratados. Por lo tanto, en el campo de la radioinmunoterapia existen pocos datos, o no los hay, que respalden la regulación al alza de antígenos en tumores sólidos.

20 La regulación al alza de antígenos coexpresados observada para la presente invención sugiere que la terapia de combinación o terapia de inducción utilizando OI-3 o derivados del mismo, incluyendo radioinmunoconjugados, se puede utilizar en combinación con la terapia dirigida frente a antígenos coexpresados.

25 **Figura 1**
Citometría de flujo con OI-3 en la línea celular de osteosarcoma humano Saos-2, utilizando anticuerpos secundarios anti murino específicos de isotipo.

30 **Figura 2**
Análisis por citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de tres individuos distintos (llamados X, Y y Z). Células: Fondo/autofluorescencia de células no marcadas. Ctrl: solo anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario solo proporciona algo de tinción de fondo. OI-3 es negativo; no se une a CMSP.

35 **Figura 3**
A: Transferencia de Western con OI-3 como anticuerpo primario. Calle 1: lisado de OHS, calle 2: lisado de A375, calle 3: lisado de SKOV-3, calle 4: calle vacía; calle 5: Patrón de proteínas MagicMark. B: Transferencia de Western con los siguientes anticuerpos primarios: OI-3 (1-4), P1H12 (calle 5-8) y EPR3208 (calle 9-12). Lisados en cada membrana: células que sobrexpresan CD146, control de lisado transfectado con vector (2, 6, 10), MelJRpost3.3 (calle 3, 6, 11) y (OHS 4, 8, 12). No hay bandas visibles para el lisado de control, para ninguno de los anticuerpos primarios.

40 **Figura 4**
Análisis por inmunohistoquímica de OI-3 conjugado con HRP. Tinción positiva para el corte de parafina de células de melanoma humano (A), para el corte de parafina de tumores de pulmón en ratones IDCG con MelJRpost3.3 (B) metastásica, y para el corte congelado de los tumores de pulmón del modelo murino (C).

45 **Figura 5**
Histograma de citometría de flujo de muestras en paralelo de líneas celulares de melanoma (A375, MelJRpost3.3, WM239), osteosarcoma (OHS) y cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7 y BT-474) teñidas con OI-3 y un anticuerpo para CD146 murino comercial, y un control de anticuerpo que no se une a IgG1; marcador específico de linfocitos B; anti CD37 (HH1). Anticuerpo secundario: Anti IgG murina FITC en todas las aplicaciones.

50 **Figura 6**
Análisis por citometría de flujo de células MelJRpost3.3, MDA-MB-231 y OHS teñidas con OI-3, 9.2.27, TP3 y HH1. Ctrl: solo anticuerpo secundario. La tinción de fondo se excluye por definición de M1 para la estadística. Para M1; porcentaje de células teñidas (%) y valor lineal de la mediana.

55 **Figura 7**
Gráfico de Scatchard (parte superior) y gráfico de unión (parte inferior).

Figura 8
Gráficos de citometría de flujo de versiones químicas de OI-3.

60 **Figura 9**
Biodistribución (% DI/g) de ¹⁷⁷Lu-OI-3 (A), ¹⁷⁷Lu-CHOI-3.1 (B) y ¹⁷⁷Lu-CHOI-3.3 (C) en ratones desnudos hembra con xenoinjertos de tumor OHS. Las barras de error corresponden al error típico.

Figura 10
Fracción de ratones con un volumen tumoral inferior a 10 veces el volumen al inicio del tratamiento en función del tiempo. Una comparación de las curvas con una prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox).

Descripción detallada de la invención

65 Los presentes inventores han analizado un nuevo anticuerpo monoclonal OI-3 frente a CD146 que tiene una Ka

relevante y unas señales prometedoras en citometría de flujo.

En el trabajo de Zhang *et al.* (2008) se generó un panel de anticuerpos monoclonales frente a CD146 utilizando un extracto purificado de CD146 como agente de inmunización. Estos anticuerpos variaron fuertemente en sus propiedades de unión con respecto a la unión a células vivas y a cortes de tejido congelados o cortes incluidos en parafina. Cuando se agruparon en dos grupos, un grupo se pudo unir a las células vivas y a los cortes de tejido congelados, y el otro grupo tiño los cortes incluidos en parafina. Se sugirió que el último grupo reconocía epítomos no expuestos en la superficie de la proteína de las células vivas, provocando así una falta de reactividad en la citometría de flujo.

Teniendo en cuenta el trabajo de Zhang *et al.* (2008), fue inesperado descubrir que OI-3 se unía a células vivas, a los cortes de tejido congelado y a los cortes incluidos en parafina. Por lo tanto, se adecuaría al sistema de clasificación que utilizaban. Esto indica que OI-3 se dirige a un epítomo versátil en CD146.

Esto podría ser, posiblemente, el efecto de utilizar células de osteosarcoma completas en lugar de extractos celulares para la inmunización que conduce al OI-3, dado que la disponibilidad de epítomos puede variar para las distintas formas de presentación del antígeno.

Por lo tanto, se indica que el anticuerpo OI-3 podría representar una mejora sustancial en el direccionamiento a células malignas que expresan CD146 con anticuerpo monoclonal.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal nuevo, OI-3, que tiene como diana el antígeno CD146 asociado al cáncer. El OI-3 se une bien a líneas celulares de varias formas distintas de cáncer, como lo indica la unión a líneas celulares de osteosarcoma, melanoma y cáncer de mama.

En este caso se presenta que el pretratamiento con otros anticuerpos para CD146 podría bloquear en cierto grado la unión de OI-3 radiomarcado a células positivas para el antígeno, pero no provocaría un bloqueo completo de la unión, mientras que el pretratamiento con OI-3 provocaría un bloqueo completo. Esta observación concuerda con la hipótesis de que el impedimento estérico provocado por una cantidad significativa de anticuerpo unido a diversos epítomos en el mismo antígeno, hace en general que el antígeno, incluido el epítomo relacionado con OI-3, sea menos accesible para las macromoléculas.

Además se demuestra que el anticuerpo OI-3 es muy adecuado para el radiomarcaje utilizando la modificación de las cadenas laterales de tirosina o lisina.

La invención incluye las estructuras de aminoácidos de OI-3 en general, y en particular las estructuras de los aminoácidos de los sitios de combinación con el antígeno.

Dentro del alcance de la invención está el uso de OI-3 para preparar anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados, o versiones basadas en el armazón de otros mamíferos, incluyendo el perro, con el mismo direccionamiento a epítomo o uno significativamente similar, así como el uso de los mismos para el diagnóstico, la formación de imágenes o la terapia contra células que expresan CD146.

El nuevo anticuerpo, el OI-3, es un anticuerpo monoclonal de la subclase IgG1. Se generó mediante un método de hibridoma convencional, es decir, inmunizando ratones con células tumorales y extractos celulares, y recogiendo más tarde células de bazo y fusionando estas con células de mieloma murinas.

La principal diferencia con respecto a la generación de otros anticuerpos anti CD146 fue el uso de células de osteosarcoma para la inmunización, en lugar de células de melanoma o extractos de células de melanoma. Para obtener un clon productivo que produzca el anticuerpo OI-3 se realizaron clonación y reclonación.

Los datos de diversos ensayos utilizando anticuerpos radiomarcados o citometría de flujo sobre un panel de células CD146 positivas y negativas fueron consistentes con la especificidad de CD146. La inmunoprecipitación seguida de la SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie del gel, indicó la precipitación de un antígeno con el mismo tamaño que el precipitado con un anticuerpo de unión a CD146.

Los datos de citometría de flujo indicaron una unión a células de melanoma y células de cáncer de mama con OI-3. Con células de osteosarcoma, tres líneas celulares fueron positivas para OI-3. Esto indica un potencial significativo para OI-3 como agente de direccionamiento antitumoral.

Se utilizó pre- y cotratamiento con una mezcla de anticuerpos monoclonales y policlonales frente a CD146, el bloqueo de OI-3 radiomarcado fue significativo pero incompleto, lo que indica que OI-3 se une a un epítomo sustancialmente distinto en el antígeno.

Esta observación concuerda con la hipótesis de que el impedimento estérico provocado por una cantidad significativa de anticuerpo unido a diversos epítomos en el mismo antígeno, hace en general que el antígeno, incluido

el epítipo relacionado con OI-3, sea menos accesible para las macromoléculas.

Anticuerpo monoclonal OI-3 y variaciones de este

5 Un aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que se une a CD146 humano y que es un anticuerpo monoclonal que está definido por una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, o un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítipo de CD146 humano que el anticuerpo definido anteriormente o que reconoce un epítipo que está cerca o se solapa con dicho epítipo, o un anticuerpo monoclonal que comparte al menos el 80 % de identidad de secuencia con los anticuerpos definidos anteriormente.

15 Una realización de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo de la presente invención que está definida por una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y cadenas pesada y ligera constantes que son de origen de mamífero.

20 Otra realización de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo de la presente invención, en la que la cadena pesada constante se selecciona del grupo que consiste en las cadenas de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la cadena ligera constante es una cadena kappa o lambda.

25 Una realización adicional de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo de la presente invención, en la que dicha cadena pesada constante comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y/o SEQ ID NO: 7 y en la que dicha cadena ligera constante comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

En una realización preferente de la presente invención, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal OI-3.

30 Dentro del ámbito de la presente invención se encuentran péptidos que reconocen epítipos, fragmentos de anticuerpo como Fab y F(ab)₂, fragmentos variables monocatenarios como diacuerpos o anticuerpo multivalentes murinos o recombinantes, con o sin secuencias de proteínas de otras especies de mamífero o que no son de mamífero, incluyendo productos producidos por expresión en hibridomas, *E. coli* u otros sistemas de expresión.

35 Para algunos fines, el OI-3 podría digerirse enzimática o químicamente para producir fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos son fragmentos funcionales de OI-3.

Anticuerpos quiméricos y humanizados obtenidos de OI-3

40 Debido a las propiedades de unión favorables del anticuerpo OI-3, es adecuado generar versiones quiméricas y/o humanas de OI-3 que podrían ser apropiadas para el uso humano.

La cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) es la subunidad polipeptídica grande de un anticuerpo (inmunoglobulina).

45 Un anticuerpo típico está compuesto por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (Ig) y dos cadenas ligeras de Ig.

Existen varios tipos distintos de cadena pesada, que definen la clase o isotipo de un anticuerpo.

50 Estos tipos de cadena pesada varían entre los distintos animales.

La cadena ligera de inmunoglobulina es la subunidad polipeptídica pequeña de un anticuerpo (inmunoglobulina).

55 En los seres humanos (como en otros mamíferos) hay dos tipos de cadena ligera, la cadena kappa (κ), codificada por el locus kappa de inmunoglobulina en el cromosoma 2 y la cadena lambda (λ), codificada por el locus lambda de inmunoglobulina en el cromosoma 22.

Los anticuerpos son producidos por linfocitos B, expresando cada uno solo una clase de cadena ligera.

60 Una vez establecida, la clase de cadena ligera permanece fija durante la vida del linfocito B.

En un individuo sano, la relación total de kappa con respecto a lambda es aproximadamente de 2:1 en suero (midiendo anticuerpos enteros intactos) o de 1:1,5 si se miden cadenas ligeras libres, siendo una relación altamente divergente indicativa de neoplasia.

65 La relación normal exacta de kappa con respecto a lambda varía de 0,26 y 1,65.

Las cadenas kappa y lambda pueden aumentar proporcionalmente, manteniendo una relación normal.

Las cadenas variable y constante en un anticuerpo quimérico o humanizado obtenido del anticuerpo monoclonal de ratón OI-3, pueden diferir de las secuencias conocidas.

5 Los ejemplos de tales variaciones son claros a partir de la presente divulgación e incluyen la selección de las cadenas constantes, la variación genética de las cadenas variables y las variaciones del dominio Fc para modular las funciones efectoras.

10 Los presentes inventores han modificado genéticamente anticuerpos quiméricos humanizados obtenidos del anticuerpo monoclonal de ratón OI-3.

Estos anticuerpos muestran un efecto prometedor en la búsqueda de un tratamiento óptimo de varios tipos de cáncer.

15 Estos efectos se muestran en los experimentos de la presente divulgación.

20 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que se une a CD146 humano y que se obtiene de un anticuerpo monoclonal que está definido por una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, o de un anticuerpo no humano que reconoce el mismo epítipo de CD146 humano que el anticuerpo definido anteriormente o que reconoce un epítipo que está cerca o se solapa con dicho epítipo; en donde dicha molécula de anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

25 En una realización de la presente invención, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico definido por una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, y cadenas pesada y ligera constantes que son de origen humano.

30 En otra realización de la presente invención la cadena pesada constante se selecciona del grupo que consiste en la cadena de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la cadena ligera constante es una cadena kappa o lambda.

35 En una realización adicional de la presente invención, se comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada constante mostrada en la SEQ ID NO: 6 y/o SEQ ID NO: 7 y en donde dicha cadena ligera constante comprende ii) la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

Identidad de secuencia

40 Como se define comúnmente, "identidad" se define en este caso como identidad de secuencia entre genes o proteínas a nivel de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

Por lo tanto, en el presente contexto, "identidad de secuencia" es una medida de identidad entre proteínas a nivel de aminoácidos y una medida de la identidad entre ácidos nucleicos a nivel de nucleótidos.

45 La identidad de secuencia de proteínas puede determinarse comparando la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada secuencia cuando se alinean las secuencias.

50 De manera similar, puede determinarse la identidad de secuencia de ácidos nucleicos comparando la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada secuencia cuando se alinean las secuencias.

55 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico o dos de aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes.

60 Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, $\text{identidad \%} = \frac{\text{n.º de posiciones idénticas}}{\text{n.º de posiciones total}} \times 100$ (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

65 Se pueden alinear manualmente las secuencias y contar el número de ácidos nucleicos o aminoácidos idénticos. Como alternativa, puede lograrse el alineamiento de dos secuencias para la determinación de la identidad porcentual usando un algoritmo matemático. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos por BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra =

12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención.

5 Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST. Como alternativa, puede utilizarse PSI-Blast para realizar una búsqueda por iteraciones que detecte relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utiliza los programas NBLAST, XBLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los respectivos programas. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Como alternativa, puede calcularse la identidad de secuencia después de haber alineado las secuencias, por ejemplo, mediante el programa BLAST en la base de datos del EMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST).

15 En general, para el alineamiento, pueden utilizarse los parámetros predeterminados respecto a, por ejemplo, la "matriz de puntuación" y la "penalización de hueco". En el contexto de la presente invención, pueden ser ventajosos los parámetros predeterminados de BLASTN y PSI BLAST.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. Al calcular la identidad porcentual, se cuentan únicamente las coincidencias exactas.

20 Una realización de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte una identidad de secuencia del 80 % con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo OI-3.

25 Una realización de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo OI-3.

30 En otra realización de la invención, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia de ácido nucleico que comparte al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo OI-3, tal como el 90 % de identidad, el 91 % de identidad, el 92 % de identidad, el 93 % de identidad, el 94 % de identidad, el 95 % de identidad, el 96 % de identidad, el 97 % de identidad, el 98 % de identidad o el 99 % de identidad.

35 Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que comparte una identidad de secuencia del 80 % con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 3) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo OI-3.

Otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 3) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo OI-3.

40 En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una secuencia de polipéptido que comparte al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 3) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo OI-3, tal como el 90 % de identidad, el 91 % de identidad, el 92 % de identidad, el 93 % de identidad, el 94 % de identidad, el 95 % de identidad, el 96 % de identidad, el 97 % de identidad, el 98 % de identidad o el 99 % de identidad.

45 En otra realización preferente de la presente invención estos anticuerpos son un anticuerpo murino, quimérico o humanizado obtenido del anticuerpo monoclonal OI-3.

Variación genética

50 La variación genética se provoca en los genes mediante la variación en el orden de las bases en los nucleótidos. Esta variación provoca mutaciones en los genes y posteriormente en las proteínas que codifican dichos genes.

Estas mutaciones pueden ser mutaciones o sustituciones con ganancia de sentido o con cambio de sentido.

55 Una realización de la presente invención se refiere a la secuencia de ácido nucleico aislada de la cadena VH (SEQ ID NO: 1) y/o la cadena VL (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo monoclonal OI-3 que comprende al menos 50, tal como 20, tal como 10, tal como 5, tal como 4, tal como 3, tal como 2, tal como 1 mutación de ganancia de sentido.

60 Otra realización de la presente invención se refiere a la secuencia de ácido nucleico aislada de la cadena VH (SEQ ID NO: 1) y/o la cadena VL (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo monoclonal OI-3 que comprende al menos 0-50, tal como 1-50, tal como 0-20, tal como 1-20, tal como 0-10, tal como 1-10, tal como 0-5, tal como 1-5, tal como 3, tal como 1 mutación de ganancia de sentido.

65 Una mutación con cambio de sentido (un tipo de mutación no sinónima) es una mutación puntual en que se cambia un único nucleótido, lo que da como resultado un codón que codifica un aminoácido distinto (las mutaciones que

cambian un aminoácido a un codón de terminación se consideran mutaciones terminadoras, en lugar de mutaciones con cambio de sentido). Una mutación de cambio de sentido puede hacer que la proteína resultante sea no sea funcional.

5 Sin embargo, no todas las mutaciones con cambio de sentido conducen a cambios apreciables de la proteína. Un aminoácido puede ser reemplazado por un aminoácido de propiedades químicas muy similares, en cuyo caso la proteína puede todavía funcionar normalmente; esto se denomina mutación neutra, "silenciosa" o conservativa.

10 Como alternativa, la sustitución de aminoácidos podría ocurrir en una región de la proteína que no afecte significativamente la estructura o función secundaria de la proteína. Cuando un aminoácido puede estar codificado por más de un codón (el denominada "código degenerado"), una mutación en un codón puede no producir ningún cambio en la traducción; esto sería una mutación sinónima (una forma de mutación silenciosa) y no una mutación con cambio de sentido.

15 Una realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido de la cadena VH (SEQ ID NO: 3) y/o la cadena VL (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo monoclonal OI-3, que comprende al menos 50, tal como 20, tal como 10, tal como 5, tal como 4, tal como 3, tal como 2, tal como 1 mutación con cambio de sentido.

20 Una realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido de la cadena VH (SEQ ID NO: 3) y/o la cadena VL (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo monoclonal OI-3, que comprende al menos 0-50, tal como 1-50, tal como 0-20, tal como 1-20, tal como 0-10, tal como 1-10, tal como 0-5, tal como 1-5, tal como 3, tal como 1 mutación con cambio de sentido.

25 Una sustitución conservativa es una sustitución de un aminoácido por otro con propiedades generalmente similares, de forma que es probable que el funcionamiento global no se vea afectado seriamente.

En otra realización de la presente invención las mutaciones con cambio de sentido son sustituciones o mutaciones conservativas.

30 Una realización adicional de la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de polipéptido aislada con el 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 3) y/o la cadena ligera variable (SEQ ID NO: 4) de OI-3, en donde la variación de secuencia son sustituciones conservativas.

35 En otra realización de la presente invención, la identidad de secuencia es una identidad del 80 %, tal como una identidad del 90%, el 91 % de identidad, el 92 % de identidad, el 93 % de identidad, el 94 % de identidad, el 95 % de identidad, el 96 % de identidad, el 97 % de identidad, el 98 % de identidad o el 99 % de identidad y la variación de secuencia son sustituciones conservativas.

40 Los fragmentos funcionales de los anticuerpos de la presente invención comprenden partes del anticuerpo OI-3 que tienen la capacidad de generar una puesta inmunitaria similar a la de OI-3.

45 Además, dichos fragmentos se pueden usar en los métodos de la presente invención en lugar de OI-3 de longitud completa.

Con el fin de mejorar la etapa de radiomarcaje, puede ser beneficioso introducir lisinas adicionales en, por ejemplo, la porción Fc del anticuerpo quimérico o humanizado de la presente invención.

50 Esto podría reducir la probabilidad de unir quelantes de unión a lisina en los sitios de combinación con el antígeno en el anticuerpo, reduciendo así el riesgo de comprometer la inmunorreactividad durante el radiomarcaje.

Los métodos para introducir lisina en, por ejemplo, la porción Fc de OI-3, son conocidas en la técnica, por ejemplo en Hemminki *et al.*, 1995.

55 Una realización de la presente invención se refiere al radioinmunoconjugado de la presente invención, que ha sido modificado mediante 10 Lys en la porción Fc de OI-3, tal como 8 Lys, tal como 6 Lys, tal como 5 Lys, tal como 4 Lys, tal como 3 Lys, tal como 2 Lys, tal como 1 Lys.

60 Para optimizar o modular una o más funciones efectoras se pueden escoger otras variaciones de la porción Fc de los anticuerpos de la presente invención.

Estas modulaciones de funciones efectoras se realizan, por ejemplo, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

65 Dichas variaciones de la porción Fc son conocidas en la técnica.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo de la presente invención que tiene una o más mutaciones en el dominio Fc, que modulan una o más funciones efectoras.

5 Radioinmunoconjugados

Un aspecto de la presente invención se refiere a un radioinmunoconjugado que se une a CD146 humano que comprende un anticuerpo de la presente invención, un enlazador y un radionúclido.

10 En un aspecto de la presente invención, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{194}Ir , ^{166}Ho , ^{159}Gd , ^{153}Sm , ^{149}Pm , ^{142}Pr , ^{111}Ag , ^{109}Pd , ^{77}As , ^{67}Cu , ^{47}Sc , ^{230}U , ^{226}Th , ^{224}Ra , ^{225}Ra , ^{131}I , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{161}Tb y ^{177}Lu .

En una realización de la presente invención el enlazador es un enlazador quelante.

15 En otra realización de la presente invención el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{177}Lu , ^{225}Ac , ^{227}Th y ^{90}Y .

En otra realización de la presente invención el radionúclido es ^{177}Lu .

20 En aún realización, el radionúclido es otro emisor beta o un emisor alfa.

El radionúclido se puede unir al anticuerpo haciéndolo reaccionar primero con un quelante bifuncional, por ejemplo, p-SCN-bn-DOTA (Macrocyclics, Tx, EE. UU), con el anticuerpo, seguido de purificación para eliminar el quelante no conjugado y después la reacción del conjugado de quelante y anticuerpo con el radionúclido, seguido de purificación para eliminar cualquier radionúclido no conjugado.

25 Como alternativa, pueden combinarse en primer lugar el quelante y el radionúclido y posteriormente conjugarse con el anticuerpo.

30 Los enlazadores quelantes como, por ejemplo, p-SCN-bn-DOTA, puede utilizarse para conjugar otros radionúclidos metálicos a anticuerpos obtenidos de OI-3, de manera similar a la descrita para ^{177}Lu .

Se podría utilizar cualquier tipo de enlazador con suficiente capacidad de formación de complejos y un grupo funcional que permita la conjugación directa o indirecta con una proteína o un péptido. Los ejemplos de tales enlazadores se describen en la bibliografía (por ejemplo, Brechbiel, 2008; Liu, 2008). Algunos ejemplos útiles son los quelantes cíclicos bifuncionales como p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-éster; quelantes lineales bifuncionales como p-SCN-Bn-DTPA y CHX-A"-DTPA.

35 En la presente invención los radionúclidos se conjugarán preferentemente con una molécula de direccionamiento utilizando quelantes bifuncionales.

Estos podrían ser quelantes cíclicos, lineales o ramificados. Se puede hacer una referencia particular a los quelantes de poliaminopoliácidos que comprenden una estructura de poliazalcano lineal, cíclica o ramificada con grupos ácidos (por ejemplo, carboxialquilo) unidos a nitrógenos de la estructura.

45 Los ejemplos de quelantes adecuados incluyen derivados de DOTA, tales como el ácido p-isotiocianatobencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (p-SCN-Bz-DOTA), y derivados de DTPA, tales como el ácido p-isotiocianatobencil-dietilentriaminopentaacético (p-SCN-Bz-DTPA), siendo el primero un quelante cíclico y el último un quelante lineal.

50 La metalación de la fracción de formación de complejo se puede realizar antes o después de la conjugación de la fracción de formación de complejo con la fracción de direccionamiento.

En general, el procedimiento de radiomarcaje será más conveniente en términos de tiempo utilizado, etc., si el quelante se conjuga con el anticuerpo antes de que tenga lugar el radiomarcaje.

55 Los principios de preparación de conjugados radiomarcados utilizando quelantes unidos a anticuerpos se describen más ampliamente en, por ejemplo, Liu, 2008.

60 Por lo tanto, los anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados obtenidos de OI-3 se pueden utilizar para preparar radioinmunoconjugados con diferencias en las propiedades de radiación y semividas eficaces.

Por ejemplo, un radioinmunoconjugado anti CD146 que consiste en un anticuerpo murino, quimérico o humanizado obtenido del anticuerpo monoclonal OI-3 de acuerdo con la presente invención, un enlazador quelante y un radionúclido emisor beta o alfa que incluye, pero sin limitación ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re ,

65

¹⁹⁹Au, ¹⁹⁴Ir, ¹⁶⁶Ho, ¹⁵⁹Gd, ¹⁵³Sm, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴²Pr, ¹¹¹Ag, ¹⁰⁹Pd, ⁷⁷As, ⁶⁷Cu, ⁴⁷Sc, ²³⁰U, ²²⁶Th, ²²³Ra, ²²⁴Ra, ²²⁵Ra, ¹³¹I, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ¹⁶¹Tb y ¹⁷⁷Lu puede prepararse y utilizarse para preparar preparaciones farmacéuticas y utilizarse en aplicaciones terapéuticas.

5 El OI-3 podría radiomarcarse a través de reactivos que son reactivos con tirosina así como con lisina, mientras se conserva una inmunorreactividad relevante, indicando la idoneidad para su uso como un conjugado, es decir, un radioinmunoconjugado, un conjugado de fármaco-anticuerpo o un conjugado de toxina-anticuerpo. Además, podrían prepararse conjugados de nanopartículas o micropartículas, incluyendo conjugados liposomales, con OI-3 o derivados de este.

10 Los conjugados de nanopartículas o micropartículas pueden obtener una retención local elevada del producto en la cavidad afectada.

15 Por lo tanto, una realización de la presente invención se refiere a una nano o micropartícula que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención, radiomarcado o frío.

Moléculas de ácido nucleico

20 Los procedimientos de humanización o la generación artificial de variaciones murinas de OI-3 aprovechan del hecho de que la producción de anticuerpos monoclonales se puede lograr utilizando ADN recombinante para crear construcciones que tengan capacidad de expresión en cultivos celulares de mamíferos.

25 Es decir, los segmentos de genes que tiene la capacidad de producir anticuerpos se aíslan y se clonan en células que se pueden cultivar en un tanque, de forma que las proteínas de anticuerpo producidas a partir del ADN de los genes clonados se puedan cosechar en grandes cantidades.

La etapa que implica ADN recombinante proporciona un punto de intervención que puede explotarse fácilmente para modificar la secuencia de la proteína del anticuerpo expresado.

30 Por lo tanto, las modificaciones de la estructura del anticuerpo que se logran en el procedimiento de humanización se efectúan todas a través de técnicas a nivel del ADN.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ADN que codifica los anticuerpos murinos, humanizados o quiméricos de la presente invención.

35 En una realización de la presente invención, la molécula de ADN codifica una región que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo murino, humanizado o quimérico de la presente invención.

40 En otra realización de la presente invención, esta región que codifica la cadena pesada variable está fusionada con una región que codifica una cadena pesada constante de origen humano.

Dicha cadena pesada constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

45 La cadena pesada constante humana también puede ser de IgE o IgM.

En una realización adicional de la presente invención, la cadena pesada constante humana comprende una o más sustituciones en la región Fc.

50 Otra realización de la presente invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena ligera variable del anticuerpo quimérico o humanizado de la presente invención.

Dicha región codificante de la cadena ligera variable puede estar fusionada con una región que codifica una cadena ligera constante de origen humano.

55 La cadena ligera constante puede ser una cadena kappa o lambda.

En una realización de la presente invención, la cadena ligera kappa de IgG1 está codificada por una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 5.

60 En otra realización de la presente invención, la cadena pesada kappa de IgG1 está codificada por una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 6.

En otra realización de la presente invención, la cadena pesada kappa de IgG3 está codificada por una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7.

65 Las moléculas de ADN pueden construirse y optimizarse para la expresión en una célula diana.

Un vector de expresión, también conocido como una construcción de expresión, es generalmente un plásmido que se utiliza para introducir un gen específico (en el presente contexto, la molécula de ADN de la presente invención) en una célula diana.

5 Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula, se produce la proteína codificada por el gen mediante la de transcripción celular y los complejos ribosómicos de la maquinaria de traducción.

10 El plásmido se modifica por ingeniería genética con frecuencia para que contenga secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y promotoras, y conducen a una transcripción eficaz del gen portado en el vector de expresión.

15 El objetivo de un vector de expresión bien diseñado es la producción de grandes cantidades de ARN mensajero estable y, por lo tanto, de proteínas.

Los vectores de expresión son herramientas básicas para la biotecnología y la producción de proteínas, tales como la insulina, que son importantes para los tratamientos médicos de enfermedades específicas, como la diabetes.

20 Después de la expresión del producto génico se precisa la purificación de la proteína, pero dado que el vector se introduce en una célula hospedadora, la proteína de interés debe purificarse a partir de las proteínas de la célula hospedadora.

25 Por lo tanto, para hacer el procedimiento de purificación fácil el gen clonado debería tener una etiqueta. Esta etiqueta podría ser una etiqueta de histidina (His) o cualquier otro péptido marcador.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere así a un vector de expresión que comprende una molécula de ADN como se describió anteriormente.

30 Las secuencias de unión al antígeno del anticuerpo OI-3 también pueden expresarse en diversos vectores para la producción de proteínas o fragmentos de fusión.

Inmunoconjugado

35 Una inmunotoxina es una proteína fabricada por el hombre que consiste en una porción de direccionamiento unida a una toxina. Cuando la proteína se une a esa célula, esta se capta por endocitosis y la toxina destruye a la célula.

Habitualmente, se utilizan para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y de unas pocas infecciones víricas.

40 Estas proteínas habitualmente están hechas de un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo, unido a un fragmento de una toxina.

La porción de direccionamiento consta de la porción Fv de un anticuerpo que se dirige a un tipo celular específico.

45 La toxina es habitualmente una proteína citotóxica procedente de una proteína bacteriana o vegetal, de la que se ha eliminado el dominio de unión natural de forma que el Fv dirija la toxina al antígeno en la célula diana.

La inmunotoxina funciona mediante el anticuerpo (u otra fracción de direccionamiento) que se une a un antígeno en la célula diana seguido por la toxina que entra y destruye a la célula.

50 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una inmunotoxina que comprende el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención o un fragmento funcional del mismo.

Los conjugados de anticuerpos pueden incluir el uso de una toxina u otros grupos citotóxicos y/o citostáticos.

60 Una clase de inmunoconjugados de fármacos citotóxicos puede consistir en cargas útiles de citotóxicas ejemplificadas por doxorubicina, maitansinoides, calicheamicina, ozogamicina, caliqueamicina, geldanamicina, maitansinoides y taxoides, así como exotoxinas peptídicas.

Otra clase son anticuerpos monoclonales conjugados a cargas útiles de toxinas ejemplificadas por exotoxina de pseudomonas, abrina, saporina y ricina.

65 Células que comprenden y expresan los anticuerpos de la presente invención

Las moléculas de ADN o los vectores de expresión descritos anteriormente pueden introducirse en células hospedadoras.

Dichas células pueden, a través de la tecnología de hibridoma, volverse células inmortalizadas que producen los anticuerpos quiméricos o humanizados.

5 La tecnología de hibridoma es una tecnología de formación de líneas celulares híbridas (denominadas hibridomas) mediante la fusión de un linfocito B productor de anticuerpos específico con una célula de mieloma (cáncer de linfocitos B) que se selecciona por su capacidad para crecer en cultivo de tejidos y por la ausencia de síntesis de cadenas de anticuerpos.

10 Los anticuerpos producidos por el hibridoma son todos de una única especificidad y, por lo tanto, son anticuerpos monoclonales (a diferencia de los anticuerpos policlonales).

15 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que porta uno o más vectores o moléculas de ADN de la presente invención.

Una realización de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que porta un vector de expresión que comprende una molécula de ADN que codifica la cadena pesada variable de OI-3 y un segundo vector de expresión que comprende una molécula de ADN que codifica la cadena ligera variable de la presente invención.

20 En una realización de la presente invención, la célula hospedadora es una de célula de mamífero.

En otra realización de la presente invención, la célula es una de célula de hibridoma.

25 Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos se aplican habitualmente en el tratamiento de enfermedades, formulados en composiciones farmacéuticas.

30 Dichas composiciones se optimizan en cuanto a parámetros tales como la tolerancia fisiológica y la vida útil.

De este modo, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una o más moléculas de anticuerpo anti CD146 de la presente invención (por ejemplo, el anticuerpo quimérico o humanizado obtenido de OI-3 o un fragmento del mismo) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Una realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se describe anteriormente, que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

40 En otra realización de la presente invención, se mencionan uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados a partir de agentes que inducen apoptosis.

45 Un producto radioinmunoterapéutico basado en OI-3 murino, quimérico u humanizado se proporcionaría típicamente como una composición farmacéutica que consiste en un radionúclido, de acuerdo con la descripción anterior, unido a través de un quelante al anticuerpo murino, quimérico o humanizado OI-3 disuelto en un solución de tampón, que en un grado sustancial mantiene la integridad química del radioinmunoconjugado y que es fisiológicamente aceptable para infusión en pacientes.

50 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprenden un radioinmunoconjugado de la presente invención y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampones no tóxicos, cargas, soluciones isotónicas, etc. Más específicamente, el vehículo farmacéutico puede ser, pero sin limitación, solución salina normal (0,9 %), solución salina medio normal, lactato de Ringer, Dextrosa al 5 %, Dextrosa al 3,3 %/solución salina al 0,3 %. El transportador fisiológicamente aceptable puede contener un estabilizador radiolítico, por ejemplo, ácido ascórbico, seroalbúmina humana que protege la integridad del radiofármaco durante el almacenamiento y el envío.

60 Una realización adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención para tratar tipos de cáncer que expresan CD146.

65 En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica es para el tratamiento de un tipo de cáncer seleccionado del grupo que consiste en osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, leucemia y cáncer de cerebro.

Un aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso

en el empobrecimiento de células que expresan CD146 en su superficie.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias.

5 CSPG4 es una diana clínicamente evaluada (Raja *et al.*, 2007), que se coexpresa en varias de las mismas malignidades que CD146. En todas las líneas celulares analizadas como positiva para la unión, OI-3 se unió en todos ellas al menos tan bien como o mejor que 9.2.27, de acuerdo con los datos de citometría de flujo. Por lo tanto, se indica que CD146 podría ser un objetivo importante para la terapia contra el cáncer u otras enfermedades malignas.

Método de producción

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden producir mediante varios métodos.

15 Un método para producir tales anticuerpos comprende transfectar una célula hospedadora de mamífero con uno o más vectores de la presente invención, cultivar la célula hospedadora, y recuperar y purificar la molécula de anticuerpo.

20 Otro método para producir tales anticuerpos comprende la construcción de células de hibridoma que produzcan los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención.

Método de tratamiento y usos

25 El uso terapéutico de una solución farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser para el tratamiento contra células malignas que expresan CD146, incluyendo, pero sin limitación, tipos de cáncer seleccionados del grupo que consiste en osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia y cáncer de cerebro.

30 Otros usos podrían ser el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y el tratamiento de los efectos relacionados con los trasplantes.

La terapia podría basarse en inmunoterapia, un conjugado de anticuerpo y fármaco, una inmunotoxina o radioinmunoterapia, incluyendo, pero sin limitación, radiación de partículas beta o radiación de partículas alfa, o una combinación de estas.

35 La terapia podría administrarse como una monoterapia o en combinación con otras terapias, preferentemente tratamientos convencionales. Dichas otras terapias pueden ser un pretratamiento, cirugía, quimioterapia (incluyendo doxorubicina, vinblastina y gemcitabina), inmunoterapia, terapia fotodinámica, un inhibidor del proteasoma (incluyendo bortezomib), inhibidores de la histona desacetilasa (incluyendo vorinostat y ácido hidroxámico suberoilánilida), vitamina D3 y análogos de vitamina D3, inhibidores de puntos de control del ciclo celular (incluyendo UCN-01 y 2-(4-(4-clorofenoxi)fenil)-1H-benzimidazol-5-carboxamida), radiosensibilizadores de células hipóxicas (incluyendo metronidazol y misonidazol), radiosensibilizadores inductores de apoptosis (incluyendo witaferina A), radioinmunoterapia o una combinación de dos o más de estos.

45 Por administrado se entiende infusión intravenosa o inyección intravenosa. Más específicamente, el agente terapéutico basado en OI-3 de la presente invención se puede administrar directamente en una vena mediante una cánula periférica conectada a una cámara de goteo que evita la embolia gaseosa y permite una estimación del caudal en el paciente.

50 En una realización, el agente terapéutico basado en OI-3 se puede administrar de forma repetida.

En otra realización de la presente invención, el agente terapéutico basado en OI-3 podría administrarse de forma repetida pero con distintas modalidades, por ejemplo, una beta radioinmunoterapia podría ser seguida de alfa radioinmunoterapia o viceversa, o un conjugado de fármaco citotóxico seguido de inmunconjugado, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del agente terapéutico basado en OI-3 de la presente invención para el tratamiento del cáncer.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del agente terapéutico basado en OI-3 de la presente invención como un medicamento.

Una realización de la presente invención se refiere al uso del agente terapéutico basado en OI-3 de la presente invención administrado en combinación con o además de otra terapia.

65 En una realización de la presente invención, las otras terapias se seleccionan de pretratamiento, quimioterapia,

terapia con anticuerpos monoclonales, cirugía, radioterapia y/o terapia fotodinámica.

En otra realización de la presente invención, las otras terapias son el trasplante de médula ósea o el trasplante y/o terapia con células madre.

5 En una realización de la presente invención, el pretratamiento se realiza administrando el anticuerpo quimérico o humanizado de la presente invención, seguido del tratamiento mediante un agente terapéutico basado en OI-3.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un tipo de cáncer seleccionado del grupo que consiste en osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, mesotelioma, glioblastoma, cáncer de páncreas, leucemia y cáncer de cerebro, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención.

15 En una realización de la presente invención los usos y métodos de tratamiento de la presente invención se realizan *in vitro* o *ex vivo*.

20 En una realización de la presente invención, la dosificación de anticuerpo es de 1-1000 mg por paciente, más preferentemente, 5-50 mg por paciente, y el radionúclido, por ejemplo, ¹⁷⁷Lu, una cantidad de 1 - 200 MBq/kg, más preferentemente, 10-100 MBq/kg de peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden el anticuerpo quimérico o humanizado de la presente invención se pueden utilizar para empobrecer las células que expresan CD146.

25 Dichas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer.

Los tipos de cáncer pueden seleccionarse del grupo que consiste en osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, leucemia y cáncer de cerebro.

30 Una realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo murino, quimérico o humanizado de la presente invención, para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias que implican la expresión celular CD146 en su patología.

35 Otra realización de la presente invención se refiere a un método para empobrecer las células que expresan CD146 en una población de células, que comprende administrar a dicha población de células una molécula de anticuerpo de la presente invención, una composición farmacéutica que contiene tal molécula de anticuerpo.

40 Aún otra realización de la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un paciente que padece un tipo de cáncer seleccionado del grupo que consiste en osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, mesotelioma, glioblastoma y cáncer de cerebro, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo murino, quimérico o humanizado de la presente invención. Otra realización de la presente invención se refiere al tratamiento del cáncer metastásico en cavidades corporales, por ejemplo, la cavidad peritoneal, la cavidad torácica/pleural y la cavidad craneal.

45 Una realización adicional de la presente invención se refiere a la administración intracavitaria de anticuerpo, conjugados o composiciones de la presente invención.

50 Los ejemplos de tales administraciones son las administraciones intraperitoneal, intrapleural e intracraneal.

55 En una realización especial de la invención, se administra a un paciente un anticuerpo OI-3 murino, quimérico o humanizado, antes de la terapia con un OI-3 murino, quimérico o humanizado radiomarcado o una versión de inmunotoxina del mismo, para bloquear las células de los tejidos normales y mejorar la captación tumoral.

60 La dosificación debería ser suficiente para bloquear la captación del tejido normal pero no excesiva, ya que esto reduciría la captación tumoral. Por ejemplo, el OI-3 murino, quimérico o humanizado debe proporcionarse en una dosificación de entre 0,5 mg y 1 g por paciente.

Podría proporcionarse, por ejemplo, una semana antes y/o 1-5 horas antes de la administración del inmunocombinado citotóxico o citostático.

65 El OI-3 y los derivados del mismo se pueden utilizar para la detección y/o el tratamiento del cáncer con expresión elevada de CD146, incluyendo, pero sin limitación, osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer de cerebro.

5 Esto incluye el tratamiento de cáncer primario, cáncer metastásico y células madre cancerosas. En algunos casos, también se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades no cancerosas. El tratamiento puede proporcionarse de forma sistémica o como una aplicación local o intralesional, y también incluye el tratamiento por perfusión de las extremidades.

10 En una realización, el anticuerpo OI-3 o derivados del mismo se utilizan para la inmunoeeliminación de células cancerosas de la sangre o la médula ósea, o de la ascitis de pacientes con cáncer. La inmunoeeliminación puede incluir el uso de anticuerpos conjugados con micro o nanopartículas magnéticas, que permiten la separación magnética durante el procedimiento de eliminación. La inmunoeeliminación puede, por ejemplo, utilizarse para purificación terapéutica de la médula ósea, la sangre o de células madre autólogas, antes de devolverlas a los pacientes sometidos a trasplante de células madre. El inmunoeeliminación también se puede utilizar para detectar antígenos o células cancerosas en sangre, médula ósea, ascitis u otros líquidos corporales.

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, que comprende; poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, inhibiendo de este modo el crecimiento de la célula tumoral.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para empobrecer las células que expresan CD146 en una población de células, que comprende administrar a dicha población de células una molécula de anticuerpo de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene tal molécula de anticuerpo.

En una realización de la presente invención los métodos se llevan a cabo *in vitro*.

25 La administración de los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se puede realizar a través de muchas vías de administración distintas, incluyendo la tópica, oral, a través del tracto gastrointestinal, intradérmica, subcutánea, nasal, intravenosa, intramuscular, entérica o parenteral.

30 Un aspecto especial de la presente invención es un método para el tratamiento del cáncer con OI-3 radiomarcado o derivados del mismo, para provocar la regulación al alza de antígenos en células cancerosas de tumores sólidos, incluyendo HER-2 y EGFR, y una terapia de combinación de OI-3 radiomarcado y derivados del mismo y anticuerpo dirigidos a HER-2 o EGFR, como un cotratamiento o tratamiento seguimiento.

35 Métodos de diagnóstico, indicación, IHQ y obtención de imágenes

La presente invención también incluye inmunoconjugados, por ejemplo, conjugados radioactivos para terapia. En una realización especial, puede ser un conjugado radioactivo para obtención de imágenes útiles para PET o SPECT. En otra realización, puede ser un conjugado no radioactivo útil para obtención de imágenes, por ejemplo, por MR.

40 El anticuerpo OI-3 o derivados pueden utilizarse para aplicaciones *in vitro*, por ejemplo, el uso diagnóstico, y aplicaciones *in vivo*. Las aplicaciones *in vivo* pueden incluir la inmunoterapia, la terapia con conjugado de anticuerpos y la obtención de imágenes *in vivo*.

45 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo monoclonal aislado de la presente invención o fragmento funcional del mismo, y detectar la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo, en donde un aumento significativo de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo a la muestra, en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento funcional del mismo a una muestra de control, diagnostica al sujeto con cáncer.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de detección del cáncer o de confirmación del diagnóstico de cáncer en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo monoclonal aislado de la presente invención o fragmento funcional del mismo, y detectar la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo, en donde un aumento significativo de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo a la muestra, en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento funcional del mismo a una muestra de control, detecta el cáncer en el sujeto o confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.

60 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para indicar el cáncer en un sujeto, que comprende; poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo monoclonal aislado de la presente invención o fragmento funcional del mismo, y detectar la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo, en donde un aumento significativo de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo a la muestra, en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento funcional del mismo a una muestra de control, indica cáncer en el sujeto.

65 Cabe señalar que un indicio no implica necesariamente una evaluación de un profesional de la medicina.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmentos funcionales del mismo están marcados directamente.

5 Otra realización de la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente, que comprende adicionalmente poner en contacto un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo, con la muestra, y detectar la unión del segundo anticuerpo, donde un aumento significativo de la unión del segundo anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del segundo anticuerpo a una muestra de control indica o detecta cáncer en el sujeto, o diagnostica al sujeto como con cáncer.

10 En una realización de la presente invención, el tipo de cáncer se selecciona del grupo que incluye, pero sin limitación, a los tipos de cánceres seleccionados del grupo que consiste en osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, leucemia y cáncer de cerebro.

15 En otra realización de la presente invención, la muestra es una biopsia, deposiciones, sangre, suero u orina.

Los tipos de diagnóstico y técnicas de imágenes incluyen citometría de flujo, IHQ, exploración por RM y todos los otros tipos de técnicas de imágenes en las que puedan detectarse anticuerpos en una muestra.

20 Kits

Un aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la producción del radioinmunoconjugado de la presente invención que comprende dos o más viales, en donde un vial contiene un conjugado que comprende un quelante unido a un anticuerpo monoclonal murino OI-3; y un segundo vial que comprende un radionúclido.

Una realización de la presente invención se refiere al kit como se describe anteriormente, en donde el radioinmunoconjugado se genera mezclando el contenido de los dos viales.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación inyectable de OI-3 quimérico u humanizado útil para pretratamiento, para bloquear en tejidos normales a CD146, antes de la radioimmunoterapia, con versiones radiomarcadas o inmunotóxicas de OI-3, que comprende al menos 0,5 mg y no más de 1 g de anticuerpo.

35 Un kit puede precisar que se realicen algunos procedimientos, por ejemplo, radiomarcaje y/o purificación, antes de que tenga lugar la infusión.

Una realización de la presente invención se refiere a un kit de la presente invención, en donde el contenido de uno o varios viales está liofilizado o en una solución.

40 Mezclando los contenidos de los dos viales para generar el radioinmunoconjugado aparecerá el producto final. Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, el radioinmunoconjugado se genera mezclando el contenido de los dos viales.

45 Este producto puede necesitar purificación antes del uso.

Cabe señalar que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a otros aspectos de la invención.

50 Todas las referencias de patente y no de patente citadas en la presente solicitud, se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

A continuación, se describirá la invención en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunización, fusión y selección del clon de hibridoma productor de anticuerpos

60 Los animales se inmunizaron inicialmente con células de osteosarcoma humano y más tarde con extractos de proteínas de la membrana celular. Se fusionaron células del bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma, de acuerdo con el procedimiento convencional para la generación de células de hibridoma.

Los sobrenadantes de todos los clones de hibridoma en cultivo de las fusiones se analizaron mediante citometría de flujo en cuanto a la unión a líneas celulares de cáncer. (Protocolo general para el cultivo de células y citometría de flujo, véase el Ejemplo 4).

65 Los sobrenadantes de los clones positivos se seleccionaron adicionalmente verificando que los anticuerpos no

mostraban unión a los aislamientos de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP).

5 Los clones seleccionados se propagaron a través de expansión, y reclonación y purificación repetidas, y se analizaron mediante citometría de flujo en un panel más amplio de líneas celulares de cáncer, así como en CMSP de individuos adicionales (descrito en el Ejemplo 4).

10 Se encontró que uno de los clones, OI-3, se unía células de osteosarcoma y de melanoma, y se subclonó y volvió a analizar hasta que se identificó un clon que producía reactividad inmunitaria relevante. Este se expandió, y las reservas se recogieron y congelaron en nitrógeno líquido.

Ejemplo 2: Identidad de secuencia de las cadenas variables del anticuerpo monoclonal murino OI-3

15 Las secuencias de ADN codificantes de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) variables del Acm OI-3 producidas por el clon de hibridoma 3_45 (anotación original) se determinaron por secuenciación del ARN del subclón de hibridoma 3_45 (A7) y el subclón 3_45 (C2). Las secuencias de VH y VL conseguidas a partir de 3_45 (C2) y 3_45 (A7) son idénticas, confirmando la identidad de OI-3.

20 El ARN total se extrajo de células de hibridoma congeladas y se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando cebadores universales. A continuación, se realizó RACE con el ADNc para amplificar los fragmentos de anticuerpos variables. Para confirmar la identidad se secuenciaron diez clones para cada fragmento variable.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena pesada variable y la cadena pesada ligera son la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

25 Las secuencias de aminoácidos que corresponden a la cadena pesada variable y la cadena pesada ligera son la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente.

La cadena pesada variable (las SEQ ID NO 1 y 3).

```

atgggatggatctggttctttctctctctctctcaggaactgcaggtgtccactctgag
M G W I W F F L F L L S G T A G V H S E
gtccagttgcagcagctctggacctgagctagtagaagactggggcttcagtgaagatatcc
V Q L Q Q S G P E L V K T G A S V K I S
tgcaaggcttctggttactcattcactggttactacatacactgggtcaagcagagccat
C K A S G Y S F T G Y Y I H W V K Q S H
ggaaagagccttgagtggttgatattagtaattacaatggtgctactacctacagc
G K S L E W I G Y I S N Y N G A T T Y S
caggagtcaagggaaggccacatttactgtagacagatcctccaggatagcctacatg
Q E F K G K A T F T V D R S S R I A Y M
cagttcaccggcctgacatctgaagactctgcggtctattactgtgcgggtaacagctgg
Q F T G L T S E D S A V Y Y C A G N S W
ggtgactggtacttcgatgtctggggcgagggaccacggtcaccgtctctca
30 G D W Y F D V W G A G T T V T V S S
    
```

La cadena pesada ligera (las SEQ ID NO 2 y 4).

atgaagttgctgttaggctgttggtgctgatgttctggattcctgctccagcagtgat
M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
gttgtgatgacccaaactccactctccctgctgtcagtccttgagatcaagcctccatc
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
tcttgcatgctagtcagagcctgtacacagtaatggaaacacctatttacattggtac
S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W Y
ctgcagaagccaggccagtcctccaaagctcctgatctacaaagttccaaccgatttct
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
gggggtcccagacaggttcagtgccagtgatcagggacagatttcacactcaagatcagc
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
agagtggaggctgaggatctgggagttatttctgctctcaaagtacacatgtttccacg
R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V S T

ttcggaggggggaccaagctggaataaaaa
F G G G T K L E I K

Ejemplo 3: Determinación de la subclase IgG para el anticuerpo OI-3

5 Se realizaron análisis por citometría de flujo con anticuerpos secundarios específicos de isotipo murino conjugados con fluorocromo (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM). Se determinó que OI-3 era del isotipo IgG1. Figura 1. (Protocolo general para el cultivo de células y citometría de flujo, véase el Ejemplo 4).

10 Ejemplo 4: Análisis de expresión de OI-3 en un panel de líneas celulares tumorales humanas y en preparaciones de CMSP recientes

15 Tres líneas celulares de melanoma humano (A375, MelJRpost3.3 y WM239), tres de osteosarcomas (OHS, KPDX y SAOS-2), tres de cáncer de mama (BT-474, MCF-7 y MDA-MB-231), cuatro líneas celulares de linfoma (Daudi, Raji, Rec-1 y DOHH2), una línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3), una línea celular pancreática (PANC-1) y una línea celular de carcinoma de células escamosas (SCC-4) se analizaron en cuanto a la expresión de OI-3. Las células se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo, (ATCC, Manassas, VA, USA) o del Departamento de Biología Tumoral en el Norwegian Radium Hospital, Oslo, Noruega (MelJRpost3.3, Lai *et al.*, 2012, WM239, Herlin *et al.*, 1990, OHS, Fodstad *et al.*, 1986, KPDX, Bruland *et al.*, 1985).

20 Las células se cultivaron en DMEM o en RPMI Gibco (Invitrogen), complementado con STF al 10 %, y con glutamina extra (Glutamax) y antibióticos (Pen/Estrep) dependiendo de la recomendación del proveedor. Las células se cultivaron en una atmósfera húmeda con aire al 95% y CO2 al 5 %. Las líneas celulares adherentes se recogieron al 80-100 % de confluencia mediante 2 x lavado en DPBS seguido de tratamiento con tripsina (TrypLE express, Invitrogen). Las células cultivadas en suspensión se recogieron por centrifugación.

25 Se analizaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de tres individuos. La sangre entera de donantes sanos extraída en vidrio con EDTA se diluyó 1:1 con DPBS (DPBS, Hyclone, Thermo Scientific, EE. UU) en un tubo de 50 ml. La sangre entera diluida se depositó en capas sobre Lymphoprep (Medinor, Noruega) en una relación de 2:1, en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1000xg durante 20 minutos con un frenado lento. Las células mononucleares de la interfaz se aspiran y se lavan dos veces con DPBS (300xg, 10 min). Las células sedimentadas se resuspenden suavemente en medio de cultivo (RPMI-1640 con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %) usando una pipeta. La cantidad de células se determinó mediante el recuento de alícuotas en Countess (Invitrogen), seguido de dilución en tampón de flujo (PBS de Dulbecco c/ BSA al 0,5 %, NaN3 al 0,1 %). Se distribuyeron 200.000 células por pocillo de muestra en una placa de 96 pocillos (Becton Dickinson PRO-BIND 96).

35 Se añadió anticuerpo secundario (fragmento F(ab')2 anti IgG de ratón (molécula completa)-FITC) y se incubó durante 30 min, y se lavó como en la etapa anterior. Los sedimentos de células lavados se disolvieron en 150 ul de tampón de flujo y se analizaron en FACS Calibur.

Todas las etapas de lavado se realizaron mediante centrifugación a 1.200 rpm en 5 min.

OI-3 se une a todas las líneas celulares de melanoma y osteosarcoma analizadas, así como a una célula de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231), una pancreático (PANC-1) y una línea celular de cáncer de células escamosas escamosa (SCC-4), Tabla 1. El anticuerpo OI-3 no se une a las otras dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y BT-474), a la línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3) ni a las líneas celulares de linfoma (Daudi, Raji, Rec-1 y DOHH2). OI-3 no mostró unión a CMSP de tres individuos distintos (Figura 2).

Tabla 1. Unión medida del anticuerpo OI-3 a un panel de líneas de células tumorales humanas mediante análisis de citometría de flujo

Tipo de tejido	Línea celular	Tipo de cáncer	Unión a OI-3
Piel	A375	melanoma maligno	sí
	WM239	melanoma metastásico	sí
	MelJRpost 3.3	melanoma maligno	sí
Hueso	OHS	osteosarcoma	sí
	KPDX	osteosarcoma	sí
	Saos-2	osteosarcoma	sí
Ovario	SKOV-3	adenocarcinoma	no
Glándula mamaria	MDA-MB-231	adenocarcinoma, sitio metastásico	sí
	MCF7	adenocarcinoma, sitio metastásico	no
	BT-474	carcinoma ductal	no
Linfoblasto	Daudi	Linfoma de Burkitt	no
	Raji	Linfoma de Burkitt	no
	Rec-1	linfoma de células del manto	no
	DOHH2	linfoma folicular, linfocito B	no
Páncreas	PANC-1	carcinoma epitelioide	sí
Lengua	SCC-4	carcinoma de células escamosas	sí
Sangre periférica	CMSP (3 ind.)	normal	no

Ejemplo 5: Identificación del antígeno diana de OI-3 por transferencia de Western

Los lisados de proteínas se hicieron a partir de una línea celular de osteosarcoma humano (OHS) y de un melanoma humano (A375), y una línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3). Se recogieron aproximadamente 10 millones de células y se lisaron con 150 µl de tampón de lisis Pierce IP (Thermo Scientific, Rockford, IL EE. UU.) con inhibidor de proteinasa Halt 1 x (Thermo Scientific) a 4 °C durante 30 minutos, antes de la centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos, seguido de la recolección del sobrenadante a partir de los residuos sedimentados. Las muestras de proteína se diluyeron en NUPAGE Sample Buffer x 4 (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.), se hirieron durante 5 minutos, se separaron mediante SDS-PAGE Criterion XT, al 4-12 % (BioRad) y transfirieron a una membrana de PVDF mediante transferencia semiseca. A continuación, la membrana se bloqueó con leche en polvo al 5 % en PBS-T (tampón de bloqueo) para impedir la unión inespecífica, seguido de incubación con anticuerpo OI-3 a una concentración de 2,5 µg/ml durante una noche a 4 °C. La membrana se lavó 4 veces en tampón de bloqueo y después se incubó con anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) en tampón de bloqueo. La detección del anticuerpo secundario se realizó utilizando el sustrato SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) y la visualización se realizó utilizando Molecular Imager® ChemiDox™ XRS+ (Bio Rad). Se detectó una banda de proteína de aproximadamente 110 kDa por la unión de OI-3 en los lisos de las líneas celulares de osteosarcoma (OHS, calle 1, Figura 3A) y de melanoma (MelJRpost3.3, calle 2, Figura 3A). No era visible ninguna banda en el lisado de la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3 (calle 3). La calle 4 está vacía (sin muestra). La calle 5, con patrón de proteínas MagicMark XP Western (Invitrogen). Los tamaños de las bandas del patrón de proteínas se muestran en el lado derecho. Basándose en el patrón de expresión en las líneas celulares tumorales humanas descritas en el Ejemplo 4 y en la unión específica a una proteína de 110 KDa por análisis de transferencia de Western, se compró un lisado comercial de células que

sobreexpresan el antígeno CD146/MCAM/MUC-18 (OriGene, Rockville, MD) y también anticuerpo monoclonal anti CD146 murino (P1H12, eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.), y un anticuerpo monoclonal de conejo frente a CD146 (EPR3208, Origene). Las bandas de proteínas idénticas, a aproximadamente 110 kDa, se detectaron mediante los anticuerpos OI-3 (calles 1-4), P1H12 (calles 5-8) y EPR3208 (calles 9-12) en lisados de células que
 5 sobreexpresan CD146 (calles 1, 5, 9), lisados de melanoma (MelJRpost3.3, calles 3, 6, 11) y células de osteosarcoma (OHS 4, 8, 12) (Figura 3B). No se observaron bandas en ninguna de las transferencias para las muestras con lisados de control (control de lisado transfectado con vector, Origene, calles 2, 6 y 11, Figura 3B). Estos resultados respaldan aún más que el antígeno diana de OI-3 es CD146.

10 Se realizó una inmunoprecipitación con proteína G Dynabeads (Invitrogen), básicamente como se describe en Wang *et al.*, 1999. Se preparó un lisado de MelJRpost3.3 como se describe para el análisis por transferencia de Western. Inicialmente, se realizó una eliminación previa con proteína G Dynabeads y el lisado de 30×10^6 células disueltas en 1 ml de DPBS con BSA al 0,5 % para eliminar las proteínas del lisado que se unen de forma inespecífica a las perlas. Después de 15 minutos de incubación a 4 °C, el lisado se retiró de las perlas mediante separación
 15 magnética. Se añadieron 4 µg de OI-3 al lisado y se incubó durante 3 h con rotación lenta en un Hulamixer a 4 °C. El lisado no unido se retiró mediante separación magnética y las perlas se lavaron 1 x c/0,75 ml de tampón de lisis (la solución se transfirió a un tubo eppendorf limpio) seguido de 1 x lavado con 0,5 ml de DPBS. Las muestras de control de proteína unida no específica a Dynabeads G, Dynabeads G con OI-3, pero no lisado, etc., se prepararon todas para SDS-PAGE mediante la adición de tampón de muestra Lamenni y β-mercaptoetanol y se
 20 desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min antes de la aplicación en un gel Criterion TGX al 4-15 %, de 18 pocillos. Después de la corrida, el gel se tiñó con azul de Coomassie. Se observó una banda fuerte de aproximadamente 110 kDa, además de bandas de 25 y 50 kDa (cadenas ligera y pesada de OI-3). Este ensayo respalda aún más que CD146 es la diana de OI-3.

25 Ejemplo 6: Estudios de inmunohistoquímica (IHQ)

Procedimientos para la tinción con IHQ de los cortes de tejido congelado: Los tejidos de un modelo de ratón metastásico (IDCG) de MelJRpost3.3 humano se congelaron instantáneamente (OCT-isopentano antes de transferirlos a nitrógeno líquido y reservarlos en un congelador a -80 °C hasta su uso). Se secaron al aire durante
 30 una hora secciones de tejido congelado de 5 µM antes de fijarlas en acetona a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los portaobjetos se secaron después a temperatura ambiente durante 10 min. Después de 2 lavados x 5 min. en Tris 0,5 M, se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena usando H₂O₂ al 3 % en metanol durante 10 min. Las secciones se lavaron con agua destilada y después 1 x 5 min con Tris 0,5 M. Las secciones se bloquearon con BSA al 5 % en PBS durante 20 min. Después, los portaobjetos se incubaron con OI-3 conjugado con peroxidasa de
 35 rábano picante (HRP) (10 µg/ml) en BSA al 2,5 % durante 60 min a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 2 X 5 min con Tris 0,5 M, y después se incubaron con DAB líquido y sistema Chromogen (Dako K3468) durante 5 min; 1 gota de DAB + Chromogen en 1 ml de tampón de sustrato (suministrado por Dako). Los cortes se aclararon en agua destilada, se sometieron a contratinción con hematoxilina durante 1-2 min, después de la eliminación del exceso de tinción con HCl al 1 % EtOH y aclarado en agua corriente fría durante 10 min. Los cortes se deshidrataron en EtOH,
 40 a continuación en xileno y se montaron en Perfix. Procedimientos para la tinción con IHQ de los cortes de tejido incluidos en parafina: Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 h, después se procesaron de forma rutinaria, se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron en cortes de 4 µM de espesor. Las secciones de tejido se desparafinaron con Tissue clear y EtOH, y se lavaron en agua destilada. Las secciones se incubaron con H₂O₂ al 3 % en metanol durante 10 minutos para bloquear la actividad de peroxidasa endógena,
 45 seguido de aclarado en agua destilada. Los portaobjetos se trataron luego con ácido cítrico 0,01 M a pH 6,0 para la recuperación de antígeno; los portaobjetos se colocaron en el horno de microondas a alta temperatura, 2 x 5 min, y después se enfriaron durante 20 min. Los portaobjetos se aclararon durante 1 min en agua corriente seguido de un aclarado en Tris 0,5 M durante 5 min. Los portaobjetos se bloquearon con BSA al 5 % en PBS durante 20 min, antes de la tinción con el anticuerpo como se describió anteriormente.

50 Se analizaron tejidos pulmonares con tumores visibles procedentes del modelo metastásico MelJRpost3.3, así como los cortes de parafina de un paciente con diseminación superficial de melanoma maligno (Clark IV). Los resultados se presentan en la Figura 4. Se observó tinción positiva para OI-3, con localización en membrana, en los cortes de metástasis de pulmón de ratones IDCG, tanto en los congelados como en los parafinados. La tinción de los cortes de parafina de la muestra del paciente mostró una tinción más difusa pero positiva.

Esto demuestra que OI-3 tiene propiedades adecuadas para la detección de células cancerosas en análisis de inmunohistoquímica.

60 Ejemplo 7: Radiomarcage de OI-3

A. Radiomarcage de OI-3 con ¹²⁵I

65 Se lavó un tubo de iodogén (Pierce) con 1 ml de tampón tris y posteriormente se añadieron 100 µl de tampón tris (pH 7,5), y se añadió yodo ¹²⁵I. La solución se agitó en el tubo suavemente unas pocas veces durante un período de 6 minutos, en el que se añadió parte o toda la solución de ¹²⁵I a un vial con, normalmente, 100 µl de tris con 50-

200 µg de anticuerpo OI-3.

La reacción continuó durante 7 minutos con agitación ocasional del vial. Después de eso, se añadieron 50 µl de I-tirosina (saturado) en tris y se hizo reaccionar durante al menos 5 minutos antes de que la solución se purificara usando una columna de exclusión por tamaño de Sephadex G-25 PD-10 (GE Health).

Aproximadamente el 70 % de la actividad eluyó en las fracciones de alto peso molecular y se recogió y analizó en cuanto a la inmunorreactividad, y se utilizó en experimentos de unión a células.

10 B. Radiomarcaje de OI-3 conjugado con Bn-DOTA

Se conjugó p-SCN-Bn-DOTA (Macrocyclics) con OI-3 de acuerdo con los procedimientos publicados. Brevemente, Se le añadió tampón de carbonato al anticuerpo OI-3 en NaCl para ajustar el pH a aproximadamente 8,5 y la concentración de anticuerpo de 3-5 mg/ml. Se añadió un exceso 4 veces molar de p-SCN-Bn-DOTA y el vial de reacción se mezcló suavemente en un thermomixer (Eppendorf) durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

La reacción se terminó con glicina 0,2 M en carbonato (pH 8,5) y se purificó mediante varios ciclos de ultrafiltración utilizando un dispositivo de filtro centrífugo (Vivaspin 20, MWCO 50 kDa, Sartorius Stedim). Durante la filtración, el disolvente se cambió a NaCl isotónico para el conjugado de quelante-anticuerpo. Después de eso, se ajustó el pH a 5,5 -6,0 añadiendo acetato de amonio y se añadió ¹⁷⁷Lu catiónico en HCl diluido, y se hizo reaccionar durante 15 minutos a 37 °C. Esto produjo un producto del 90-100 % de rendimiento radioquímico (si se realizó menos del 95 % de purificación por filtración en gel con Sephadex PD-10).

En conclusión: El anticuerpo monoclonal OI-3 podía radiomarcarse a través de la tirosina y de la lisina con una buena retención de las propiedades de unión. Esto indica que puede ser apropiado para crear inmunoconjugados para terapia, etc.

Ejemplo 8: Unión a células de OI-3 radiomarcado.

30 Se utilizaron para estudiar la unión del anticuerpo monoclonal OI-3 radiomarcado las líneas celulares de cáncer humano MelJRpost 3.3 (melanoma), OHS (osteosarcoma) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama).

Las líneas celulares se cultivaron como monocapas en matraces de plástico a los que se suministró medio RPMI 1640/suero de ternera fetal, etc., y que se mantuvieron en incubadores de CO2 al 5 %. Después del tratamiento con tripsina, se centrifugaron las células, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS de Dulbecco con seroalbúmina bovina al 0,5 % (DPBS/BSA).

Las concentraciones de las células se ajustaron a 25-50 millones de células por ml. Se añadieron doscientos cincuenta microlitros de las suspensiones celulares a tubos de reacción de 4 ml. A los duplicados se les añadió 2 microgramos de (1) IgG1 irrelevante HH1 (Smeland *et al.*, 1985). Cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y a continuación se puso en un agitador durante aproximadamente 20 minutos para presaturar el antígeno.

Después de eso, se añadieron a cada tubo aproximadamente 2,7 nanogramos de OI-3 marcado con ¹²⁵I. Después de eso, cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y se incubó en un agitador durante 1-2 horas. Después de eso, cada tubo se contó en un contador gamma para determinar la actividad aplicada, se lavó tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA y se recontó para determinar la fracción unida a las células.

Resultados: La fracción unida a las células varió entre el 40 y el 80 % (Tabla 2).

En conclusión, OI-3 radiomarcado presentó una unión relevante (fracción inmunorreactiva) en los ensayos de unión a células.

55 Tabla 2. Unión de ¹²⁵I-OI-3 a una línea celular de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231), una línea celular de melanoma (MelJRpost3.3) y de osteosarcoma (OHS) después del pretratamiento de las líneas celulares con anticuerpos fríos.

Pretratamiento	MDA-MB-231	MelJRpost3.3	OHS
IgG irrelevante HH1	100 %	100 %	100 %
OI-3	12 %	11 %	12 %
Los datos para ¹²⁵ I-OI-3 y la IgG irrelevante HH1 se normalizaron al 100 %.			

Ejemplo 9: Ensayo de bloqueo de antígeno/epítipo

Para estudiar el bloqueo de la unión de OI-3 al antígeno diana se utilizaron las líneas celulares de cáncer humano MelJRpost3.3 (melanoma) y OHS (osteosarcoma). Las líneas celulares se cultivaron como monocapas en matraces de plástico a los que se suministró medio RPMI 1640/suero de ternera fetal, etc., y que se mantuvieron en incubadores de CO₂ al 5 %. Después del tratamiento con tripsina, se centrifugaron las células, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS de Dulbecco con seroalbúmina bovina al 0,5 % (DPBS/BSA). Las concentraciones de las células se ajustaron a aproximadamente 10 millones de células por ml. Se añadieron doscientos microlitros de las suspensiones celulares a tubos de reacción de 4 ml. Inicialmente, se realizó un ensayo de bloqueo con una mezcla de anticuerpos anti CD146 disponibles en el mercado (monoclonal de ratón anti CD146 (P1H12), monoclonal de ratón anti Mel-CAM (OJ97cMUC18), monoclonal de conejo anti CD146 (ERP3208), policlonal de conejo anti Mel-Cam (H-62). El ensayo se llevó a cabo por duplicado, añadiendo 10 µg de cada anticuerpo de bloqueo. Las muestras de control negativo se procesaron con una mezcla de anticuerpos que se sabe que se unen a antígenos en células OHS (monoclonal murino anti CSPG4 (LHM-2 y 9.2.27, Erbitux). A las muestras de control se añadieron 10 µg de cada anticuerpo. Los anticuerpos LHM-2 y 9.2.27 se unen a MelJRpost3.3, Erbitux no, pero esta línea celular se incluyó en el experimento de bloqueo de la unión de OI-3. Cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y a continuación se puso en un agitador durante aproximadamente 20 minutos para presaturar el antígeno. Después de eso, se añadieron a cada tubo aproximadamente 2,7 nanogramos de OI-3 marcado con ¹²⁵I. Después de eso, cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y se incubó en un agitador durante 30-60 minutos. Después de eso, cada tubo se contó en un contador gamma para determinar la actividad aplicada, se lavó tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA y se recontó para determinar la fracción unida a las células.

Los primeros datos presentados en la Tabla 3 muestran que la mezcla de anticuerpos frente a CD146 bloqueó de forma significativa la unión de ¹²⁵I-OI-3, tanto en células MelJRpost3.3 como en células OHS, mientras que la mezcla de anticuerpos frente a CSPG4 y EGFR no mostró bloqueo significativo de ¹²⁵I-OI-3 (el nivel del fondo de unión de ¹²⁵I-OI-3 a las células pretratadas con OI-3 frío fue inferior al 2 % en el ensayo). El experimento se repitió con preincubación de MelJRpost3.3 con monoclonal de ratón anti Mel-CAM (OJ97cMUC18) y policlonal de conejo anti Mel-Cam(H-62) en muestras separadas. El monoclonal murino anti CD-146 analizado no bloqueó la unión de OI-3, mientras que el anticuerpo policlonal, cuando se usó para el pretratamiento solo, redujo la unión al 57 %. La reducción específica en la unión de OI-3 para las muestras tratadas con anticuerpos anti-CD146 respalda aún más que ¹²⁵I-OI-3 se dirige al antígeno CD146. Cabe señalar que los anticuerpos CD146 solo redujeron la unión y no provocaron un bloqueo completo, que concuerda con la hipótesis de que OI-3 se dirige a un único epítipo y que otros anticuerpos para CD146 solo provocan un impedimento estérico de la unión cuando las células se pretratan con cantidades saturantes de mezclas de anticuerpos para CD146.

Tabla 3. Unión específica en % de ¹²⁵I-OI-3 después del pretratamiento con anticuerpos.

Pretratamiento	MelJRpost3.3	OHS
Mezcla de anticuerpos anti CD146	30 %	35 %
Mezcla de anticuerpo anti CSPG4 y EFR	99 %	95 %
policlonal de conejo anti Mel-CAM (H-62)	58 %	n/a
monoclonal de ratón anti Mel-CAM (OJ97cMUC18)	101 %	n/a
OI-3	3 %	2 %
Los datos para la unión específica de ¹²⁵ I-OI-3 sin ningún pretratamiento se establecieron como el 100 %		

Ejemplo 10: Expresión comparativa de OI-3 y un anticuerpo comercial anti CD146 en líneas celulares diana seleccionadas

La unión selectiva de OI-3 se evaluó mediante análisis por citometría de flujo de un panel de líneas celulares tumorales como se describe en el Ejemplo 4. El análisis de expresión comparativo mediante análisis por citometría de flujo se realizó con OI-3 y con un anticuerpo monoclonal murino comercial anti CD146 (OJ79c MUC18). La análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 4, añadiéndose los anticuerpos primarios a una concentración de 10 µg/ml a aproximadamente 200.000 células y se incubó durante 30 min seguido de 2 x lavados en tampón de flujo. Se añadió anticuerpo secundario (fragmento F(ab')₂ anti IgG de ratón (molécula completa)-FITC) y se incubó durante 30 min, y se lavó como en la etapa anterior, y se disolvió en 150 µl de tampón de flujo y se analizó en FACS Calibur. Tanto OI-3 como OJ79c MUC18 son anticuerpos murinos IgG1, y se utilizó un anti CD37 (HH1), un anticuerpo IgG1 específico de linfocitos B en muestras de control en paralelo. Se analizaron tres líneas celulares de melanoma, una de osteosarcoma y tres de cáncer de mama. Todas las líneas celulares mostraron un patrón de unión similar (perfiles de histogramas) para OI-3 y OJ79c MUC18, Figura 5. MCF-7 y BT-474 no mostraron una unión de los anticuerpos nula o baja. La similitud en el patrón de unión de los anticuerpos a las líneas celulares respalda la especificidad de OI-3 para CD146, a pesar de que el experimento del Ejemplo 6 muestra que los anticuerpos no se unen al mismo epítipo.

Ejemplo 11: Expresión comparativa de OI-3 para líneas celulares de cáncer humanas con respecto a otros

anticuerpos específicos de osteosarcoma y de melanoma

La propiedad de unión de OI-3 se ha comparado mediante análisis por citometría de flujo con anticuerpos que se han estudiado anteriormente como candidatos a Radiolmmuno Conjugates (RIC) para el tratamiento del osteosarcoma (anti p80; TP-3, Bruland *et al.*, 1988) y el melanoma (anti CSPG4; 9.2.27, sc-8003, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Se utilizó un marcador anti CD37 específico de linfocitos B como control negativo/de isotipo (HH1). Los ensayos se realizaron como se describe en el Ejemplo 4. Como se documenta en el Ejemplo 4, OI-3 se une a todas las líneas celulares de melanoma y osteosarcoma analizadas, así como a células de cáncer de mama triple negativo que mostraron ser positivas para CSPG4 (MB-231, Wang *et al.*, 2010), véase la Tabla 1. Se ha documentado que CSPG4 se expresa también en líneas celulares de osteosarcoma (Godal *et al.*, 1986). Se analizaron tres líneas celulares que son doble positivas para OI-3 y 9.2.27 (MelJRpost3.3, MDA-MB-231 y OHS), Figura 6. OI-3 mostró una intensidad mayor que 9.2.27 en las tres líneas celulares y, además, mayor intensidad que TP-3 en la línea celular OHS. Esto indica que el antígeno y los epítomos a los que se dirige OI-3 podrían ser relevantes en la detección y la terapia contra cáncer, y que OI-3 tiene propiedades favorables como agente de direccionamiento.

Ejemplo 12. Evaluación de la afinidad utilizando 125 I-OI-3 y células de melanoma *in vitro*.

Se preparó una suspensión de células de 10 millones de células Mel 3.3 por ml en DPBS/BSA al 0,5 %. Se añadieron 200 μ l de suspensión de células a tubos de 4 ml. Como control se utilizaron células pretratadas con 24 μ g de OI-3. Se prepararon seis concentraciones de 125 I-OI-3 que variaban de 2 ng a 6252 ng por tubo.

Después de aproximadamente dos horas, contó la actividad total de las células, se lavó tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA al 0,5 % usando centrifugación y se eliminó el sobrenadante, y finalmente se recontó la actividad unida a las células. La actividad neta unida a las células se determinó restando las cuentas del sedimento de células bloqueadas de los sedimentos de no bloqueadas a los mismos niveles de actividad.

Resultados:

Del % de actividad unida se obtuvo la concentración molar, utilizando un factor de ajuste de 5000 para normalizar a nmol/l (nM) para cada tubo. La concentración de reactivo libre se ajustó para la fracción inmunorreactiva del lote de 125 I-OI-3 utilizado a aproximadamente 0,6. Los datos se presentan en la Figura 7.

Utilizando los datos de unión a partir de las células incubadas con diversas cantidades de anticuerpo conteniendo el trazador radioactivo, se midió la actividad unida a las células en el equilibrio aproximado después de dos horas de mezcla.

En el equilibrio se usó la siguiente aproximación: $K_a = 1/K_d$ además $K_d = \frac{1}{2} \beta_{\text{máx}}$.

Por lo tanto, una $\beta_{\text{máx}}$ de aproximadamente 3,0 produciría (a partir de la interpolación del gráfico de unión) una k_d de 3,1 nM, lo que se traduce en una K_a de aproximadamente $3,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Estos números parecen estar en buena concordancia con el gráfico de Scatchard, donde el punto de intersección en el eje X está aproximadamente en 3,1 nM = K_d). La K_d está dentro del mismo intervalo que los anticuerpos terapéuticos comercializados; K_d de Rituximab = 8 nM (Rituxan, ficha técnica; Genentech, Fecha de revisión de la guía ged. inc. julio 2012), K_d de Trastuzumab = 8,2 nM (Costantini *et al.*, 2007) y K_d de Erbitux = 0,2 nM (información sobre el producto, Bristol-Myers Squibb Canadá, diciembre de 2012).

Ejemplo 13: Clonación recombinante; Análisis de variantes quiméricas humanas/de ratón de OI-3, CHOI-3.1 (IgG1) y CHOI-3.3 (IgG3)

A: Se construyeron plásmidos recombinantes que codificaban las cadenas pesada (SEQ ID NO: 1 y 3) y ligera (SEQ ID NO: 2 y 4) de OI-3 en combinación con regiones constantes de la cadena ligera IgG/ k humana (SEQ ID NO: 5) e IgG1/k (SEQ ID NO: 6) o IgG3/k (SEQ ID NO: 7). Los plásmidos se transfectaron de forma transitoria en cultivos de células CHO en suspensión.

Los anticuerpos diana, CHOI-3.1 y CHOI-3.3, se capturaron a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante una columna HiTrapTM ProteinA HP de 5 ml. El análisis de los anticuerpos por SDS-PAGE reducida y no reducida y el peso molecular estimado por Western confirmaron una cadena pesada de ~ 55 kDa, una cadena ligera de ~25 kDa y anticuerpos de longitud completa de ~150 kDa, respectivamente.

SEQ ID NO:5
región constante de la cadena ligera hIgG/k

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGA
CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:6
región constante de la cadena ligera hlgG1/k

5

GCCTCCACCAAGGGACCAAGCGTGTTCCCACTGGCTCCATCTAGTAAAAGTACTTCAGGG
GGAACCGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTATTTCCCAGAGCCCCTGACAGTGAG
CTGGAAGTCCGGCGCCCTGACCTCCGGAGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCAA
GCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTGGTGACCGTGCCCAGTTCAAGCCTGGGGACTCAG
ACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGTAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAA
CCCAAGAGCTGTGATAAAAACACATACTTGCCCCCTTGTCTGCTCCAGAGCTGCTGGGA
GGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGATTTCCAGGACA
CCCGAAGTGAAGTGCCTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAA
CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCAGGGAGGAACAG
TACAATAGCACCTATCGCGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA
CGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAAA
CAATTAGCAAGGCCAAAGGGCAGCCTCGGGAACCACAGGTGTACACTCTGCCTCCATCC
AGAGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCTGACTTGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCT
TCAGATATTGCTGTGGAGTGGGAAAGCAATGGACAGCCAGAAAACAATTACAAGACCAC
ACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACTGTGGATAAA
AGTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAA
TCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCTGGCAA

10

SEQ ID NO:7
región constante de la cadena ligera hlgG3/k

GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCCCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACTTCCCGGCTGTCCTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
AGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
GAGCTCAAACCCCACTTGGTGACACAACCTCACACATGCCACGGTGCCAGAGCCCAA
ATCTTGTGACACACCTCCCCCATGCCACGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGAC
CGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGATACCCTTATGATTTCCCGGACCCCTG
AGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC
AACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAGCGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAACACCACG
CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

- B: Análisis de la especificidad de unión de CHOI-3.1 y CHOI-3.3 a una línea celular de melanoma: Se realizaron análisis de unión para verificar que las variantes quiméricas de OI-3 tienen las mismas propiedades de unión que el OI-3 murino. Análisis por citometría de flujo de lotes iguales de células de melanoma MelJRpost3.3 incubadas con CHOI-3.1 o CHOI-3.3 20, 10 o 5 µg/ml, seguido de lavado e incubación con anticuerpo IgG anti humano conjugado con PE (específico para Fc gamma, eBioscience). Protocolo para el cultivo de células y la citometría de flujo; véase el Ejemplo 4. CHOI-3.1 o CHOI-3.3 mostraron unión específica a la línea celular de melanoma (Figura 8).
- 10 C: Experimento de bloqueo utilizando CHOI-3.1 y CHOI-3.3 para bloquear ¹²⁵I-OI-3:
- Para estudiar el bloqueo de OI-3 mediante CHOI-3.1 y CHOI-3.3 se usó la línea celular de cáncer humano MelJRpost 3.3 (melanoma). Como control negativo se utilizó el monoclonal murino IgG1 HH1 frente a CD37 humano. Las líneas celulares se cultivaron como monocapas en matraces de plástico a los que se suministró medio RPMI 1640/suero de ternera fetal, etc., y que se mantuvieron en incubadores de CO2 al 5 %. Después del tratamiento con tripsina, se centrifugaron las células, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS de Dulbecco con seroalbúmina bovina al 0,5 % (DPBS/BSA). La concentración de las células se ajustó a aproximadamente 10 millones de células por ml.
- 20 Se añadieron doscientos microlitros de las suspensiones celulares a tubos de reacción de 4 ml. A los duplicados se les añadió IgG irrelevante HH1 o 1 microgramo cada uno de CHOI-3.1 o CHOI-3.3. Cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y a continuación se puso en un agitador durante aproximadamente 20 minutos para presaturar el antígeno.
- 25 Después de eso, se añadieron a cada tubo aproximadamente 80 nanogramos de OI-3 marcado con ¹²⁵I. Después de eso, cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y se incubó en un agitador durante 1-2 horas. Después de eso, cada tubo se contó en un contador gamma para determinar la actividad aplicada, se lavó tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA y se recontó para determinar la fracción unida a las células. Los datos (Tabla 4) muestran que las dos versiones quiméricas de OI-3 bloquean la unión de ¹²⁵I-OI-3 de forma eficaz y de modo similar a lo encontrado con el pretratamiento y el cotratamiento con el OI-3 murino original. Cabe señalar que no se espera un bloqueo completo con la concentración de anticuerpo de aproximadamente 5 µg/ml utilizada en este ensayo. Esto verifica que las versiones quiméricas se dirigen al mismo epítipo que el anticuerpo OI-3 original.
- 30

Tabla 4. Unión de ¹²⁵I-OI-3 a células de melanoma MelJRpost3.3 después del pretratamiento y el cotratamiento con anticuerpos.

Pretratamiento	HH1 (irrelevante)	CHOI-3.1	CHOI-3.3
Fracción unida relativa*	100 %	21,6 %	19,5 %
*Los datos para ¹²⁵ I-OI-3 y la IgG irrelevante HH1 se normalizaron al 100 %.			

5 D: Fracción de unión a células de las versiones quiméricas radiomarcadas del OI-3: CHOI-3.1 y CHOI-3.3 se radiomarcaron con ¹²⁵I, de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 7. Las fracciones de unión a células se determinaron de acuerdo con el Ejemplo 8: Para estudiar la unión de los anticuerpos monoclonales CHOI-3.1 y CHOI-3.3 radiomarcados se utilizó la línea celular de cáncer humano Mel 3.3 (melanoma).

10 La línea celular se cultivó como monocapa en matraces de plástico a los que se suministró medio RPMI 1640/suero de ternera fetal, etc., y que se mantuvieron en incubadores de CO2 al 5 %. Después del tratamiento con tripsina, se centrifugaron las células, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS de Dulbecco con seroalbúmina bovina al 0,5 % (DPBS/BSA).

15 Las concentraciones de las células se ajustaron a 40 millones de células por ml. Se añadieron cien y ochenta µl de la suspensión celular a tubos de reacción de 4 ml. A los duplicados se les añadió 20 µl de DPBS/BSA o 20 µl de OI-3 (1,2 mg/ml) como bloqueo del antígeno. Cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y a continuación se incubó en un agitador durante aproximadamente 20 minutos para presaturar el antígeno.

20 Después de eso, se añadieron a cada tubo aproximadamente 2,1 nanogramos de CHOI-3.1 marcado con ¹²⁵I o 4,5 nanogramos de CHOI-3.3 marcado con ¹²⁵I. Después de eso, cada tubo se mezcló por rotación durante 5 segundos y se incubó en un agitador durante 1,5 horas.

25 Después de eso, cada tubo se contó en un contador gamma para determinar la actividad aplicada, se lavó tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA y se recontó para determinar la fracción unida a las células.

Se asumió que las células bloqueadas representaban la unión no específica. La unión a células neta se calculó como unión total - unión no específica. Por lo tanto, se determinó que la actividad unida a células neta era del 58 % y 61 % respectivamente para ¹²⁵I-CHOI-3.1 y ¹²⁵I-CHOI-3.3.

30 En conclusión: Estos resultados están buena concordancia con los encontrados en este ensayo para OI-3 radiomarcado, lo que demuestra que la plataforma de hibridoma/anticuerpo OI-3 es muy adecuada para utilizarse en la generación de anticuerpos y derivados recombinantes.

35 E: Capacidad de los clones quiméricos de OI-3 para reunir linfocitos citolíticos naturales humanos para la destrucción de células tumorales *in vitro*: Se realizaron ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) con células diana marcadas con ⁵¹Cr (WM239, melanoma humano): Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos (175 cm²) usando RPMI-1640 (Hyclone, Thermo Scientific, EE.UU), complementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor (PAA, Thermo Scientific, USA). Los cultivos se recogieron por tratamiento con tripsina seguido de centrifugación (1200 rpm) durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en medio de ensayo (RPMI, STF al 10 %) y se determinó el recuento celular. La concentración celular se ajustó a 5x10⁶/ml para el marcaje con cromo-51. Se marcaron 5x10⁶ células WM239 con 3,7 MBq de cromo-51 (⁵¹Cr) (PerkinElmer, Holanda), en un volumen de 1 ml a 37 °C durante 1 hora. Las células marcadas se lavaron tres veces en DPBS con SFT al 2 %, tres veces por mediante centrifugación (2000 rpm, 5 min). Las células marcadas se alicuotaron en volúmenes iguales para la unión de OI-3, (lote: 3278) CHOI-3.1 (lote: 176799-1), CHOI-3.3 (lote: 176799-4), incluyendo un control sin anticuerpo presente. Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 10 min y después se lavaron dos veces en DPBS con SFT al 2 %, tres veces mediante centrifugación (2000 rpm, 5 min).

50 Células efectoras: Para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se utilizaron aproximadamente 30 ml de sangre entera extraída en vidrio con EDTA de un donante sano. La sangre entera se diluyó 1:1 con DPBS (DPBS, Hyclone, Thermo Scientific, EE. UU) en un tubo de 50 ml. La sangre entera diluida se depositó en capas sobre Lymphoprep (Medinor, Noruega) en una relación de 2:1, en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1000xg durante 20 minutos con un frenado lento. Las células mononucleares de la interfaz se aspiran y se lavan dos veces con DPBS (300xg, 10 min). Las células sedimentadas se resuspenden suavemente en medio de cultivo (RPMI-1640 con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %) usando una pipeta y el recuento de células se determina en el contador de células). Los linfocitos NK se aíslan mediante el empobrecimiento de células que no son NK a partir de CMSP mediante Dynabeads Untouched Human NK cells (Invitrogen), siguiendo el protocolo de los fabricantes, y se utilizan como células efectoras en el ensayo. Las células NK se estimulan/o no con interleucina-2 recombinante humana (25 ng/ml, eBiosciences) durante 2-3 horas, antes de iniciar el ensayo de ADCC.

60 ADCC: Las células diana se cultivan con células efectoras en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo, en una relación de 20:1, en un volumen final de 200 µl. En primer lugar se siembran en placa 10.000

células diana en un volumen de 100 µl en medio de ensayo, seguido de linfocitos NK humanos (ADCC) en un volumen de 100 µl. Como controles, se cultivan células diana en medio de ensayo solo (*lisis espontánea*) y en medio de ensayo complementado con Triton X-100 al 1 % (*lisis máxima; liberación total*). Todas las muestras se procesan por triplicado. El cocultivo se incubó a 37 °C en una incubadora húmeda de CO₂ durante 4 horas. El efecto citotóxico se mide por la liberación de ⁵¹Cr en el sobrenadante. Al final de la incubación, las células se retiran del medio de cultivo por centrifugación (1500 rpm; 5 min) a temperatura ambiente. Los sobrenadantes sin células (150 µl/pocillo) se transfieren a 96 microtubos de 0,2 ml correspondientes. La cantidad de ⁵¹Cr liberado se midió con un contador gamma (Cobra II, Packard, land). El % de lisis específica se calcula con la siguiente ecuación: $100 \times (\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación total} - \text{liberación espontánea})$. Siendo la liberación experimental el valor medio de las repeticiones de un tratamiento de la muestra. Las muestras por triplicado para la liberación espontánea y la liberación total se procesan para cada grupo de tratamiento con anticuerpo, y los valores medios se utilizan para las muestras experimentales del tratamiento con anticuerpo respectivo. Los resultados mostrados en la Tabla 5 muestran que las variantes quiméricas de OI-3, CHOI-3.1 y CHOI-3.3, tienen la capacidad de mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos por células efectoras inmunes humanas. Los linfocitos NK no estimulados no median la destrucción de las células diana cuando no se han tratado con anticuerpo (sin Acm), o cuando se han tratado con un anticuerpo quimérico irrelevante (cetuximab, que no se une a WM239), mientras que median un 15 % de lisis específica cuando las células diana se pretratan con CHOI-3.1 o CHOI.3.3. Cuando las células NK se han tratado con IL-2 por adelantado, el nivel de lisis específica aumenta considerablemente (58-60 %), lo que indica que el estado de actividad de los linfocitos NK es de importancia, como se esperaba, para la actividad ADCC. La estimulación con IL-2 también aumenta la destrucción de células diana independiente de anticuerpo, como se observa por la lisis específica (32-36 %) observada en muestras tratadas sin Acm o con cetuximab.

Tabla 5. Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, % de lisis específica de células diana mediada por el tratamiento con anticuerpo (línea celular de melanoma WM239) por células efectoras (linfocitos NK, c/sin estimulación con IL-2).

tratamiento con Acm	células NK no estimuladas	células NK estimuladas con IL-2
sin Acm	1 %	36 %
CHOI-3.1	15 %	58 %
CHOI-3.3	16 %	60 %
Cetuximab	0 %	32 %

Ejemplo 14: Biodistribución de OI-3 marcado con ¹²⁵I en ratones DESNUDOS con tumores s.c. de OHS

La capacidad de OI-3 para dirigirse a tejidos tumorales *in vivo* se elevó en ratones desnudos con tumores de OHS subcutáneos xenoinjertados. El marcaje de anticuerpos se llevó a cabo como en el Ejemplo 7: Se incluyeron en el estudio ambos OI-3 murinos, las versiones quiméricas de OI-3 (CHOI-3.1 y CHOI-3.3). Se sabe que el anticuerpo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) Cetuximab se une a OHS, y se utilizó como control positivo en el estudio, junto con el anticuerpo irrelevante HH1 dirigido a CD37 usado como control negativo. Se inyectaron 0,2-1 MBq de anticuerpo marcado en la vena de la cola de cada ratón. Los animales se sometieron a eutanasia 24 horas después de la inyección y se recogieron tejidos, se pesaron y se midieron en un Cobrall para determinar el nivel de actividad. Se incluyeron 4-5 ratones por cada anticuerpo examinado. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Relaciones de la radioactividad en tejido con respecto a sangre a las 24 h después de la inyección de anticuerpos marcados con ¹²⁵I en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de OHS. Se calculó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido.

Tejido: sangre	OI-3	CHOI-3.1	CHOI-3.3	Cetuximab	HH1
Tumores: sangre	1,04	1,30	1,10	0,97	0,34
Bazo: sangre	0,18	0,48	0,29	0,45	0,23
Hígado: sangre	0,23	0,46	0,29	0,67	0,36
Riñón: sangre	0,32	0,33	0,31	0,39	0,23

Se demuestra que OI-3 y las versiones quiméricas de OI-3 analizadas tenían todas capacidades de direccionamiento tumoral *in vivo* significativas, lo que es una característica esencial para el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra el cáncer o conjugados de los mismos. Esto confirma que las propiedades de combinación con el epítipo de OI-3 son relevantes para el uso *in vivo*. En comparación con Cetuximab radiomarcado, que se dirige al EGFR, y con el control negativo de antígeno, HH1 radiomarcado, las variantes de OI-3 tenían mejores proporciones de tumor con respecto a sangre. Esto confirma que OI-3 y sus derivados tienen propiedades prometedoras de direccionamiento al tumor *in vivo*.

Ejemplo 15: Biodistribución de OI-3 marcado con ¹⁷⁷I en ratones DESNUDOS con tumores s.c. de OHS

5 Se examinó la distribución de la radioactividad en diversos tejidos en función del tiempo después de la administración de los anticuerpos OI-3 marcados con ¹⁷⁷Lu. Figura 9. Los anticuerpos se marcaron como se describe en el Ejemplo 1. Los anticuerpos se inyectaron a dosificaciones entre 2-19 ug por ratón (con actividades en el intervalo de 150-1200 kBq/ratón). No se detectaron diferencias significativas en la cinética de distribución *in vivo* de las variantes del anticuerpo OI-3. Todos los conjugados se absorben rápidamente en la mayoría de los tejidos, incluyendo los tumores. La radioactividad en los tumores aumentó hasta 4 días después de la inyección, con un máximo entre los 2 y 4 días, mientras que, durante el mismo período de tiempo, la captación en los tejidos normales disminuye o permanece esencialmente sin cambios. La variante química de IgG1 tuvo la captación en tumor más alta, con una captación medida máxima ligeramente superior al 20 % de DI/g en el día 4. Como cabía esperar, los niveles de actividad en sangre tienen un máximo en el primer punto de tiempo, antes de que disminuya marcadamente. Debe apreciarse que la captación en el fémur y el cráneo fue baja, lo que indica que no hay ¹⁷⁷Lu libre, es decir, que todos los radioinmunoconjugados tenían una estabilidad elevada *in vivo*.

Ejemplo 16: Retraso del crecimiento tumoral con CHOI-3.1 marcado con ¹⁷⁷Lu en ratones con xenoinjerto

20 Se llevó a cabo un estudio a pequeña escala para evaluar el efecto de ¹⁷⁷Lu-CHOI-3.1 sobre el crecimiento de xenoinjertos de OHS en ratones desnudos. Una semana después de la implantación, se inyectó a los ratones, por vía intravenosa, 100 µl de NaCl (grupo de control, N=5) o 400 MBq/kg de ¹⁷⁷Lu-CHOI-3.1 (N=4). El crecimiento tumoral se determinó midiendo los diámetros del tumor con un calibrador. Se asumió una forma elipsoide y los

25 volúmenes tumorales se calcularon como $V = \frac{a^2 b}{2}$, donde a y b son los diámetros corto y largo del tumor, respectivamente. Los xenoinjertos tenían volúmenes de 45-200 mm³ al inicio del estudio y el tamaño tumoral se midió 3 veces por semana durante hasta 3 semanas después de la inyección. Después de eso, las mediciones se realizaron dos veces a la semana, a menos que se necesitara una inspección más frecuente. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical si el diámetro tumoral más grande se aproximaba a 20 mm, el peso corporal disminuía un 20 % desde el inicio o, aparte de eso, si los ratones mostraban síntomas de enfermedad y malestar. La Figura 10 muestra que los animales tratados tuvieron un retraso temporal hasta aumentar 10 veces el volumen tumoral, en comparación con el control.

Ejemplo 17: Exposición a ¹⁷⁷Lu-OI-3 de las células y efecto sobre la expresión del antígeno

35 La línea celular MDA-MB-231 se sembró en matraces de 25 cm² a los que se suministró 5 ml de medio de cultivo. Se añadieron al matraz 150 µl de A: tampón de PBS/BSA al 0,5 % o de B: 150 µl de A (tampón de PBS/BSA al 0,5 %) con 20 µg de anticuerpo monoclonal OI-3, o C: 150 µl de A (tampón PBS/BSA al 0,5 %) con 20 µg y 0,7 MBq de ¹⁷⁷Lu-OI-3. Los matraces se mantuvieron en un incubador de CO₂ durante tres días, las células se lavaron y se trataron con tripsina, y se disolvieron en PBS/BSA al 0,5 %. Se determinó el número de células/ml y se añadió ¹²⁵I-Herceptin 1,6 µg/ml para evaluar la unión al antígeno HER-2. La actividad aplicada se midió utilizando un contador gamma. Después de 1 hora de agitación a temperatura ambiente, las células se centrifugaron tres veces y se lavaron con 0,5 ml de DPBS/BSA. Después de eso, las células se contaron en el contador gamma y los números de cuentas de ¹²⁵I se ajustaron con respecto al exceso con respecto a ¹⁷⁷Lu. La unión no específica de ¹²⁵I-Herceptin a tubos vacíos también se restó de los números de cuentas. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

45 La unión a las células ¹²⁵I-Herceptin aumentó significativamente en las células tratadas con ¹²⁵I-OI-3, en comparación con los controles y el anticuerpo OI-3 frío, lo que indica una regulación positiva del antígeno para HER-2. Conclusión: El tratamiento con OI-3 radiomarcado puede mejorar el direccionamiento posterior con anticuerpos frente a antígenos coexpresados en células tumorales.

50 Tabla 7 Captación de ¹²⁵I-Herceptin en células cancerosas que coexpresan CD146 y HER-2.

Pretratamiento	Media (porcentaje unido frente al control)	Intervalo (porcentaje unido frente a la media de los controles)
DPBS/BSA (0,5 %)	100	97,0-103,0
DPBS/BSA (0,5 %) + OI-3 4 µg /ml	118	101,7-134,6
DPBS/BSA (0,5 %) + OI-3 4 µg/ml radiomarcado con ¹⁷⁷ Lu	149	140,6 - 156,7

Referencias

55 Aldovini D, Demichelis F, Doglioni C, Di Vizio D, Galligioni E, Brugnara S, Zeni B, Griso C, Pegoraro C, Zannoni M, Gariboldi M, Balladore E, Mezzanzanica D, Canevari S, Barbareschi M.M-CAM expression as marker of poor

- prognosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 15 de octubre de 2006;119(8):1920-6.
- 5 Bardin N, Reumaux D, Geboes K, Colombel JF, Blot-Chabaud M, Sampol J, Duthilleul P, Dignat-George F. Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. Enero de 2006;12(1):16-21.
- 10 Bidlingmaier S, He J, Wang Y, An F, Feng J, Barbone D, Gao D, Franc B, Broaddus VC, Liu B. Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma. *Cancer Res*. 15 de febrero de 2009;69(4):1570-7.
- 15 Bruland O, Fodstad O, Pihl A. The use of multicellular spheroids in establishing human sarcoma cell lines in vitro. *Int J Cancer*. 15 de enero de 1985;35(6):793-8.
- 20 Bruland OS, Fodstad O, Stenwig AE, Pihl A. Expression and characteristics of a novel human osteosarcoma-associated cell surface antigen. *Cancer Res*. 15 de septiembre de 1988;48(18): 5302-9.
- 25 Costantini DL, Chan C, Cai Z, Vallis KA, Reilly RM. (111)In-labeled trastuzumab (Herceptin) modified with nuclear localization sequences (NLS): an Auger electron-emitting radiotherapeutic agent for HER2/neu-amplified breast cancer. *J Nucl Med*. Agosto de 2007;48(8):1357-68.
- 30 Elgström E, Ohlsson TG, Tennvall J, Nilsson R. Pattern of antigen expression in metastases after radioimmunotherapy of a syngeneic rat colon carcinoma utilizing the BR96 antibody. *Exp Hematol Oncol*. 13 de noviembre de 2012;1(1):34.
- 35 Esteban JM, Kuhn JA, Felder B, Wong JY, Battifora H, Beatty JD, Wanek PM, Shively JE. Carcinoembryonic antigen expression of resurgent human colon carcinoma after treatment with therapeutic doses of 90Y-alpha-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody. *Cancer Res*. 15 de julio de 1991;51(14):3802-6.
- 40 Filshie RJ, Zannettino AC, Makrynikola V, Gronthos S, Henniker AJ, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Simmons PJ, Bradstock KF. MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia*. Marzo de 1998;12(3):414-21.
- 45 Fodstad O, Brøgger A, Bruland O, Solheim OP, Nesland JM, Pihl A. Characteristics of a cell line established from a patient with multiple osteosarcoma, appearing 13 years after treatment for bilateral retinoblastoma. *Int J Cancer*. 15 de julio de 1986;38(1):33-40.
- 50 Godal A, Bruland O, Haug E, Aas M, Fodstad O. Unexpected expression of the 250 kD melanoma-associated antigen in human sarcoma cells. *Br J Cancer*. Junio de 1986;53(6):839-41.
- 55 Harputluoglu H, Dizdar O, Altundag K. Potential targeted therapy options in the management of basal cell subtype of breast carcinoma. *Hum Pathol*. Diciembre de 2007;38(12):1869; respuesta del autor 1870.
- 60 Hemminki A, Hoffren AM, Takkinen K, Vehniainen M, Makinen ML, Pettersson K, Teleman O, Söderlund H, Teeri TT. Introduction of lysine residues on the light chain constant domain improves the labelling properties of a recombinant Fab fragment. *Protein Eng*. Febrero de 1995;8(2):185-91.
- 65 Herlyn M. Human melanoma: development and progression. *Cancer Metastasis Rev*. Septiembre de 1990;9(2):101-12.
- Iyer AK, Su Y, Feng J, Lan X, Zhu X, Liu Y, Gao D, Seo Y, Vanbrocklin HF, Courtney Broaddus V, Liu B, He J. The effect of internalizing human single chain antibody fragment on liposome targeting to epithelioid and sarcomatoid mesothelioma. *Biomaterials*. Abril de 2011;32(10):2605-13.
- Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, Yan H, Lu D, Ye Z, Hao J, Feng J, Yang D, Yan X. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 13 de septiembre de 2012;120(11):2330-9.
- Kristiansen G, Yu Y, Schlüns K, Sers C, Dietel M, Petersen I. Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol*. 2003;25(2):77-81.
- Lai F, Jiang CC, Farrelly ML, Zhang XD, Hersey P. Evidence for upregulation of Bim and the splicing factor SRp55 in melanoma cells from patients treated with selective BRAF inhibitors. *Melanoma Res*. Junio de 2012;22(3):244-51.
- 65 Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller G, Johnson JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res*. 1 de febrero de 1987;47(3):841-5.

- Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Diciembre de 1989;86(24):9891-5.
- 5 Ma X, Liu J, Wu J, Yan X, Wu P, Liu Y, Li S, Tian Y, Cao Y, Chen G, Meng L, Xu G, Wang S, Lu Y, Ma D, Zhou J. Synergistic killing effect between vorinostat and target of CD146 in malignant cells. *Clin Cancer Res*. 1 de noviembre 2010;16(21):5165-76.
- 10 McGary EC, Heimberger A, Mills L, Weber K, Thomas GW, Shtivelband M, Lev DC, Bar-Eli M. A fully human antimelanoma cellular adhesion molecule/MUC18 antibody inhibits spontaneous pulmonary metastasis of osteosarcoma cells in vivo. *Clin Cancer Res*. 15 de diciembre de 2003;9(17):6560-6.
- 15 Melnikova VO, Bar-Eli M. Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res*. Octubre de 2006;19(5):395-405.
- 20 Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P, Anract P, Cantagrel A, Cattani P, Reimund JM, Aguilar L, Amalric F, Girard JP. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 y CD146. *J Pathol*. Julio de 2005;206(3):260-8.
- 25 Orborn A, Eriksson SE, Elgström E, Ohlsson T, Nilsson R, Tennvall J, Strand SE. The Intratumoral Distribution of Radiolabeled 177Lu-BR96 Monoclonal Antibodies Changes in Relation to Tumor Histology over Time in a Syngeneic Rat Colon Carcinoma Model. *J Nucl Med*. Agosto de 2013;54(8):1404-10.
- Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. Diciembre de 2007;2(12):751-60.
- 30 Pickl WF, Majdic O, Fischer GF, Petzelbauer P, Faé I, Waclavicek M, Stöckl J, Scheinecker C, Vidicki T, Aschauer H, Johnson JP, Knapp W. MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol*. 1 de marzo de 1997;158(5):2107-15.
- 35 Raja C, Graham P, Abbas Rizvi SM, Song E, Goldsmith H, Thompson J, Bosserhoff A, Morgenstern A, Apostolidis C, Kearsley J, Reisfeld R, Allen BJ. Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther*. Junio de 2007;6(6):846-52.
- 40 Schlom J, Molinolo A, Simpson JF, Siler K, Roselli M, Hinkle G, Houchens DP, Colcher D. Advantage of dose fractionation in monoclonal antibody-targeted radioimmunotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2 de mayo de 1990;82(9):763-71.
- 45 Sers C, Riethmuller G, Johnson JP. MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer Res*. 1 de noviembre 1994;54(21):5689-94.
- Shih IM, Nesbit M, Herlyn M, Kurman RJ. A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol*. Noviembre de 1998;11(11):1098-106.
- 50 Sievers EL, Senter PD. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu Rev Med*. 2013;64:15-29.
- Singh S, Sharma A, Robertson GP. Realizing the clinical potential of cancer nanotechnology by minimizing toxicologic and targeted delivery concerns. *Cancer Res*. 15 de noviembre 2012;72(22):5663-8.
- 55 Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther*. Agosto de 2006;5(8):1909-17.
- 60 Smeland E, Funderud S, Ruud E, Kiil Blomhoff H, Godal T. Characterization of two murine monoclonal antibodies reactive with human B cells. Their use in a high-yield, high-purity method for isolation of B cells and utilization of such cells in an assay for B-cell stimulating factor. *Scand J Immunol*. Marzo de 1985;21(3):205-14.
- Voutsas IF, Mahaira LG, Fotopoulou K, Kapranos N, Reclus JG, Gritzapis AD, Papamichail M, Perez SA, Baxevanis CN. Gamma-irradiation induces HER-2/neu overexpression in breast cancer cell lines and sensitivity to treatment with trastuzumab. *Int J Radiat Biol*. Mayo de 2013;89(5):319-25.
- 65 Wang B, Chen YB, Ayalon O, Bender J, Garen A. Human single-chain Fv immunoconjugates targeted to a melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan mediate specific lysis of human melanoma cells by natural killer cells and complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 de febrero de 1999;96(4):1627-32.
- Wang X, Osada T, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Katayama A, McCarthy JB, Brufsky A, Chivukula M, Khoury T, Hsu

DS, Barry WT, Lyerly HK, Clay TM, Ferrone S. CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst. 6 de octubre de 2010;102(19):1496-512.

5 Wu GJ, Wu MW, Wang SW, Liu Z, Qu P, Peng Q, Yang H, Varma VA, Sun QC, Petros JA, Lim SD, Amin MB. Isolation and characterization of the major form of human MUC18 cDNA gene and correlation of MUC18 overexpression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression. Gene. 14 de noviembre 2001;279(1):17-31.

10 Zhang Y, Zheng C, Zhang J, Yang D, Feng J, Lu D, Yan X. Generation and characterization of a panel of monoclonal antibodies against distinct epitopes of human CD146. Hybridoma (Larchmt). Octubre de 2008;27(5):345-52.

Listado de secuencias

15 <110> Oncoinvent AS Bønsdorff, Tina Bjørnlund Larsen, Roy Hartvig

<120> Anticuerpo monoclonal y derivados

<130> 50249PC01

20 <150> PA 2012 70532

<151> 2013-09-24

<160> 7

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 414

30 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

atgggatgga tctggttctt totottcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60

gtccagttgc agcagttctg acctgagcta gtgaagactg gggcttcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggttactc attcactggt tactacatac actgggtcaa gcagagccat 180

ggaaagagcc ttgagtggat tggatatatt agtaattaca atggtgctac tacctacagc 240

caggagttca agggcaaggc cacatttact gtagacagat cctccaggat agcctacatg 300

cagttcaccg gcctgacatc tgaagactct ggggtctatt actgtgcggg taacagctgg 360

ggtgactggt acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

35 <210> 2

<211> 390

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

40 <400> 2

ES 2 686 692 T3

atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgtttccacg 360
 ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa 390

<210> 3
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 3

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

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

Thr Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Asn Tyr Asn Gly Ala Thr Thr Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Arg Ser Ser Arg
 85 90 95

Ile Ala Tyr Met Gln Phe Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Gly Asn Ser Trp Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 115 120 125

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

10

<210> 4
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 4

ES 2 686 692 T3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

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

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys
 130

5 <210> 5
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 5

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tcctccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgtttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcttg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

15 <210> 6
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

ES 2 686 692 T3

gcctccacca agggaccaag cgtggtccca ctggctccat ctagtaaaag tacttcaggg 60
 ggaaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gattatctcc cagagcccgt gacagtgagc 120
 tggaaactccg gcgccctgac ctccggagtg cacacatttc cagctgtgct gcagtcaagc 180
 ggctgtact ctctgtcctc tgtggtgacc gtgccagtt caagcctggg gactcagacc 240
 tatatctgca acgtgaatca caagccaagt aatacaaaag tggacaagaa agtggaaacc 300
 aagagctgtg ataaaacaca tacttgcccc ccttgtcctg ctccagagct gctgggagga 360
 ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagcct aaagacacc tgatgatttc caggacacc 420
 gaagtgactt gcgtgggtgt ggacgtgtct cacgaggatc ctgaagtga gttcaactgg 480
 tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagaccaaac ccagggagga acagtacaat 540
 agcacctatc gcgtgggtgtc cgtgctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 600
 gagtataagt gcaaagtgag caataaggcc ctgccgctc ctatcgagaa aacaattagc 660
 aaggccaaag ggcagcctcg ggaaccacag gtgtacactc tgcctccatc cagagacgag 720
 ctgacaaaga accaggtgtc tctgacttgt ctggtgaaag ggttctatcc ttcagatatt 780
 gctgtggagt gggaaagcaa tggacagcca gaaaacaatt acaagaccac acccctgtg 840
 ctggactctg atggaagttt ctttctgtat tctaagctga ctgtggataa aagtccgtgg 900
 cagcagggca acgtgttttag ctgttccgtg atgcatgagg cctgcacaa tcattacacc 960
 cagaagtctc tgagtctgtc acctggcaaa 990

5 <210> 7
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 7

ES 2 686 692 T3

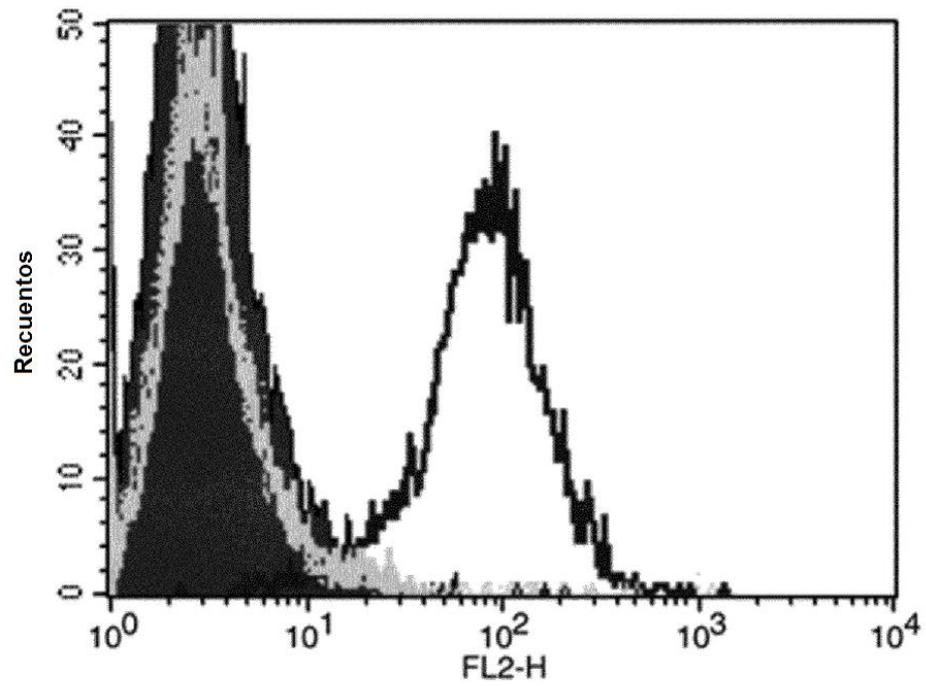
gctagcacca agggcccatac ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag caccctggg	60
ggcacagcgg cctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtccctca	180
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagctc	300
aaaacccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt	360
gacacacctc ccccatgcc acggtgccc gcaacctgaac tcctgggagg accgtcagtc	420
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggatacc cttatgattt cccggacccc tgaggtcacg	480
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac ccgagggtcc agttcaagtg gtacgtggac	540
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgttc	600
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	660
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaacaaa	720
ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag	780
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	840
tgggagagca gcgggcagcc ggagaacaac tacaacacca cgcctcccat gctggactcc	900
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	960
aacgtcttct catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1020
ctctccctgt ctccgggtaa a	1041

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que se une a CD146 humano y que es
- 5 a) un anticuerpo monoclonal que está definido por
- i) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y
- ii) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, o
- 10 b) un anticuerpo monoclonal que comparte al menos el 90 % de identidad de secuencia con los anticuerpos definidos en a).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es el anticuerpo monoclonal OI-3.
- 15 3. Una molécula de anticuerpo que se une a CD146 humano y que se obtiene de un anticuerpo monoclonal que está definido por
- a) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y
- b) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4,
- 20 en donde dicha molécula de anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
4. Un radioinmunoconjugado que se une a CD146 humano que comprende:
- 25 a) un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
- b) un enlazador, y
- c) un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{194}Ir , ^{166}Ho , ^{159}Gd , ^{153}Sm , ^{149}Pm , ^{142}Pr , ^{111}Ag , ^{109}Pd , ^{77}As , ^{67}Cu , ^{47}Sc , ^{230}U , ^{226}Th , ^{223}Ra , ^{224}Ra , ^{225}Ra , ^{131}I , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{161}Tb y ^{177}Lu .
- 30 5. El radioinmunoconjugado de unión a CD146 de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el enlazador es un enlazador quelante.
6. Molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 35 7. Molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena ligera variable de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 40 8. Un vector de expresión que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 6 y/o la molécula de ADN de la reivindicación 7.
9. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o un fragmento funcional del mismo.
- 45 10. Una célula hospedadora que porta uno o más vectores de la reivindicación 8.
11. Una línea de células de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 50 12. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a CD146 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso como un medicamento.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 60 15. Un método de producción de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende transfectar una célula hospedadora de mamífero con uno o más vectores de la reivindicación 8, cultivar la célula hospedadora, y recuperar y purificar la molécula de anticuerpo.
- 65 16. Un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto, que comprende; Poner en contacto, *in vitro*, una muestra del sujeto con el anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1-3 o un fragmento funcional del mismo, y detectar la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo,

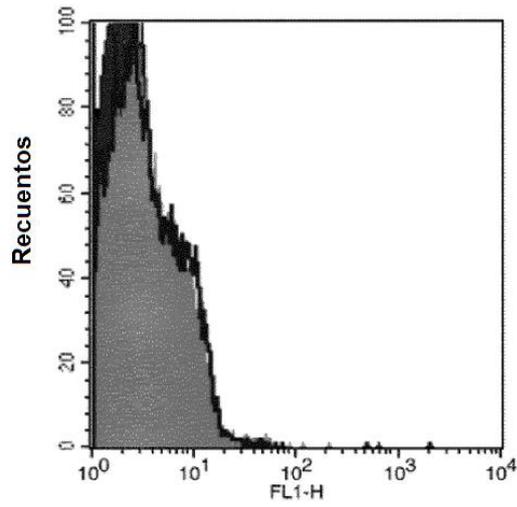
en donde un aumento significativo de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento funcional del mismo a la muestra, en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento funcional del mismo a una muestra de control, diagnóstica al sujeto con cáncer.

- 5 17. Un kit para la producción del radioinmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, que comprende dos o más viales, en donde un vial contiene un conjugado que comprende un quelante unido a un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y un segundo vial que comprende un radionúclido.
- 10 18. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 o derivados del mismo, incluyendo radioinmunoconjugados, para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende:
- 15 a) regular al alza con el anticuerpo monoclonal la expresión de HER-2, EGFR u otros antígenos coexpresados con CD146 en células cancerosas, y
- b) dirigirse a uno o más de estos antígenos coexpresados con un anticuerpo de direccionamiento.
19. Una solución farmacéutica que comprende un radioinmunoconjugado que consiste en un radionúclido terapéutico conjugado con un anticuerpo de direccionamiento a CD146 o derivado de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento de tumores, que comprende la regulación al alza de HER-2 y
- 20 EGFR en células tumorales de cánceres sólidos, incluyendo cáncer de mama, de próstata, de pulmón y melanoma, así como osteosarcoma y cáncer colorrectal.
20. Un método para diagnosticar el cáncer *in vitro/ex vivo* utilizando el anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1-3 o fragmento funcional del mismo.
- 25

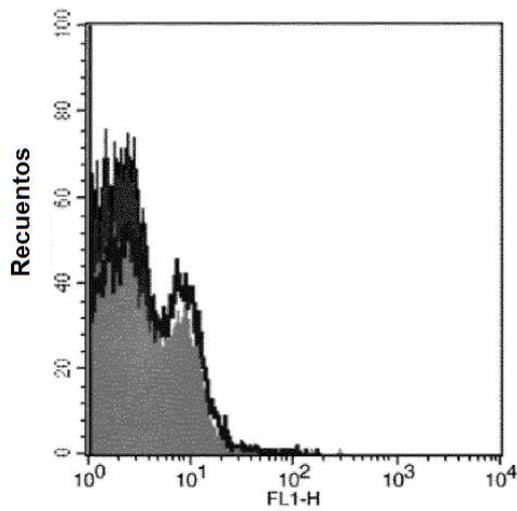


Leyenda	Nombre	Parámetro	Portal
■	Saos_2_celler.001	FL2-H	G1
—	Saos_2_igG1.056	FL2-H	G1
—	Saos_2_gG2a.057	FL2-H	G1
—	Saos_2_igG2b.058	FL2-H	G1
—	Saos_2_igG3.059	FL2-H	G1
.....	Saos_2_igM.060	FL2-H	G1

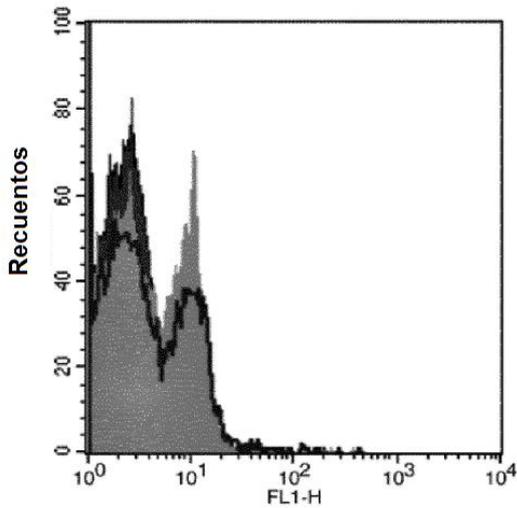
Figura 1



Clave	Nombre	Parámetro	Portal
■	PBMC_X_cells	FL1-H	G1
■	PBMC_X_ctr	FL1-H	G1
—	PBMC_X_OI3	FL1-H	G1

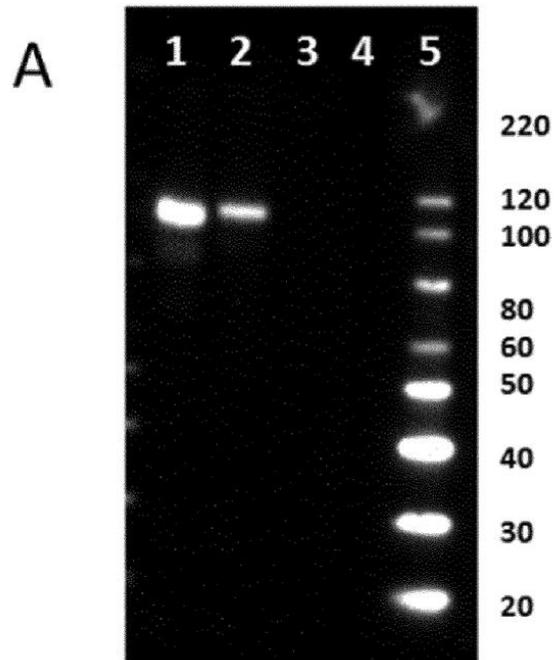


Clave	Nombre	Parámetro	Portal
■	PBMC_Y_cells	FL1-H	G1
■	PBMC_Y_ctr	FL1-H	G1
—	PBMC_Y_OI3	FL1-H	G1



Clave	Nombre	Parámetro	Portal
■	PBMC_Z_cells	FL1-H	G1
■	PBMC_Z_ctr	FL1-H	G1
—	PBMC_Z_OI3	FL1-H	G1

Figura 2



B

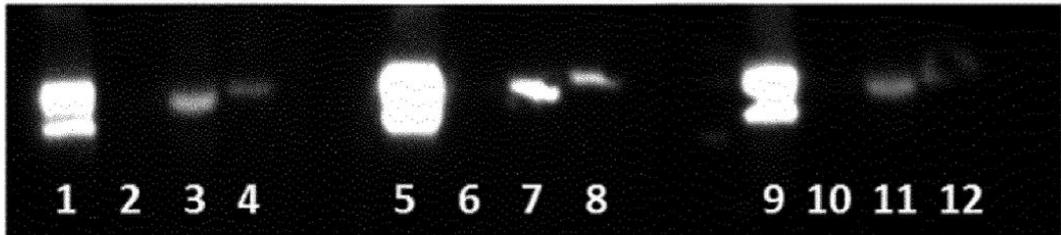


Figura 3

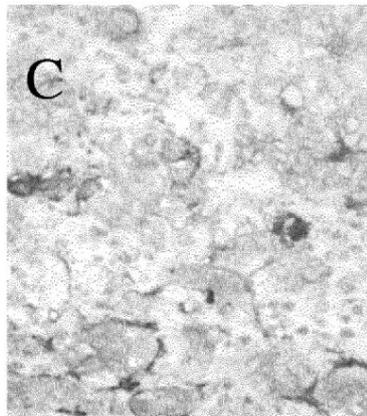
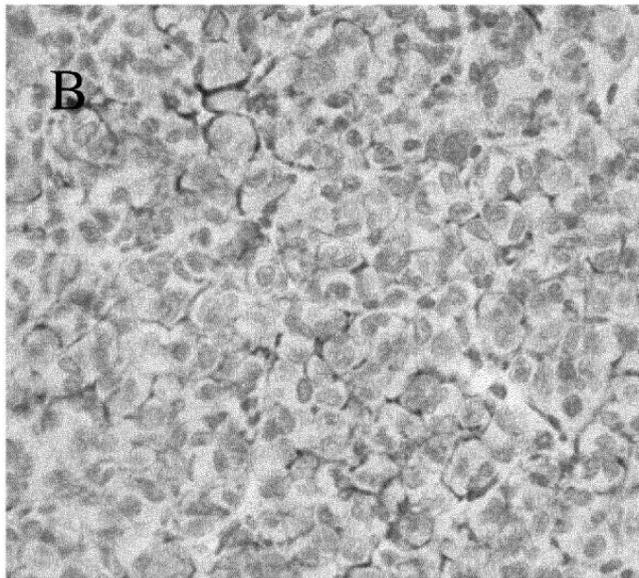
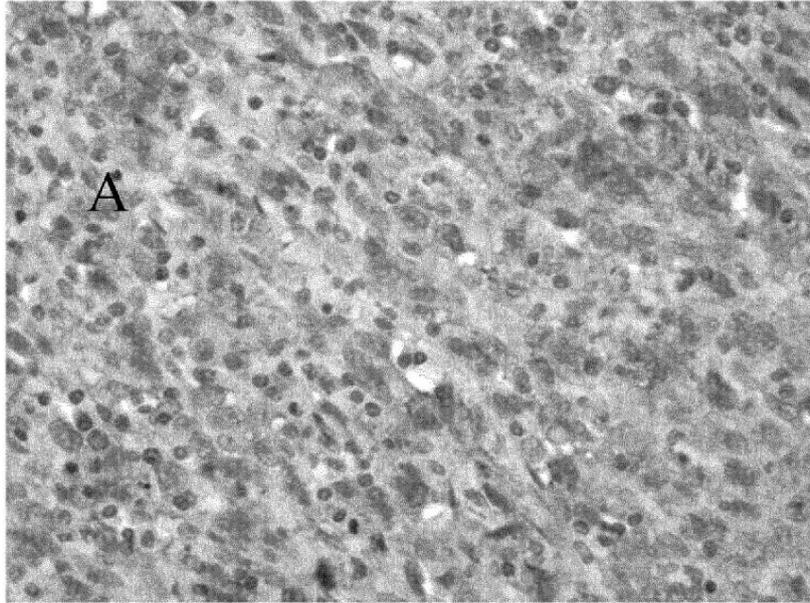


Figura 4

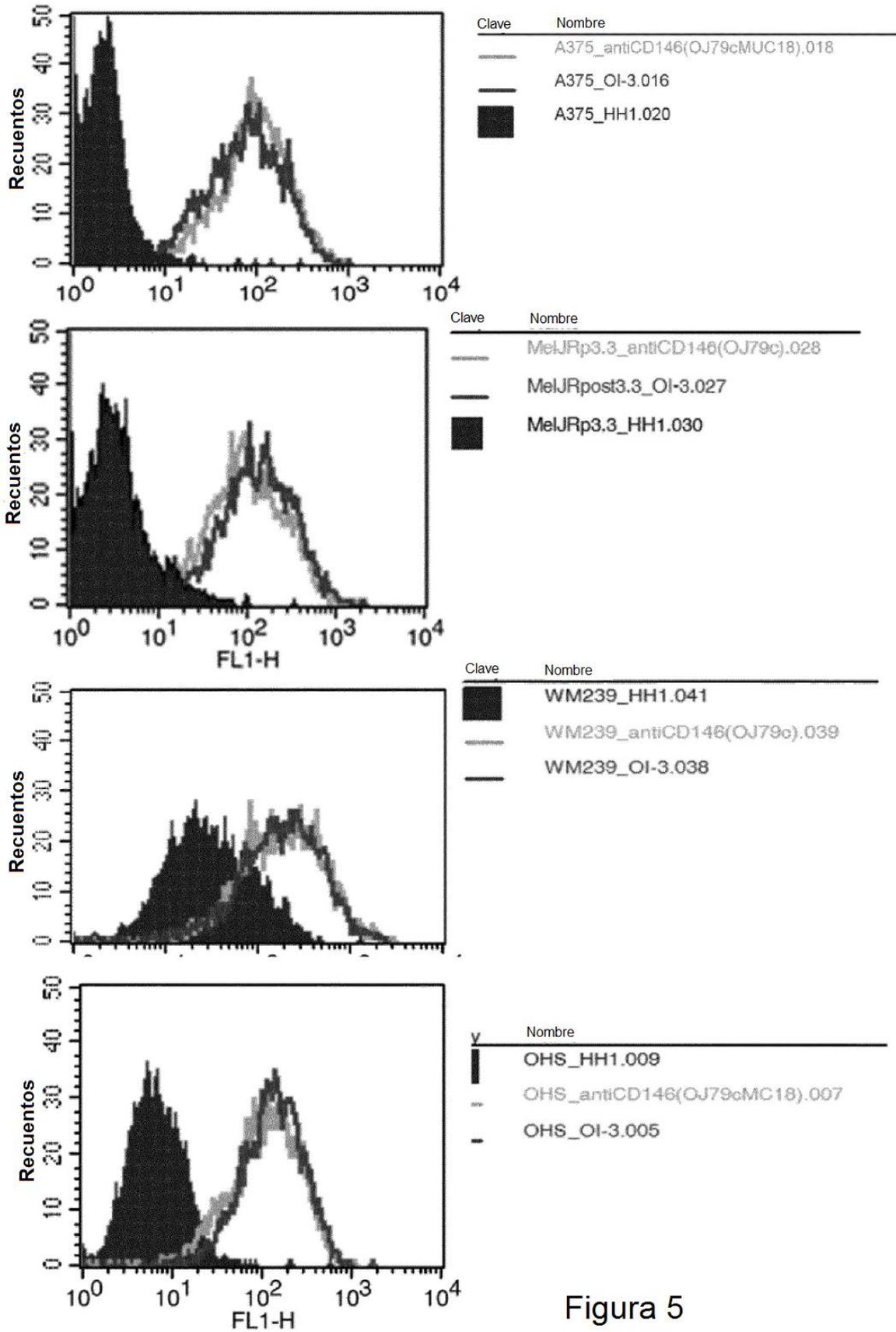


Figura 5

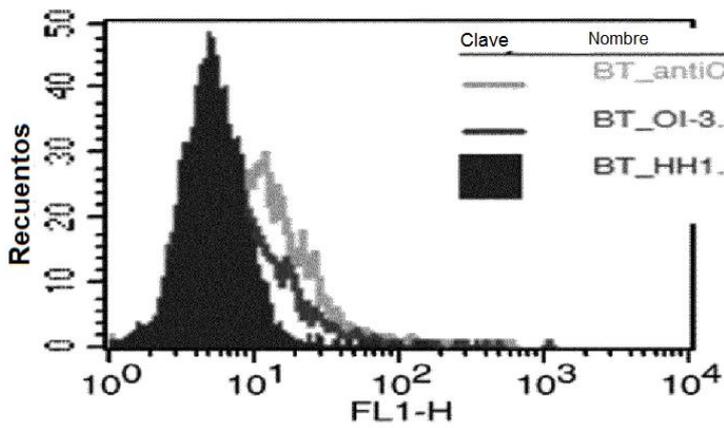
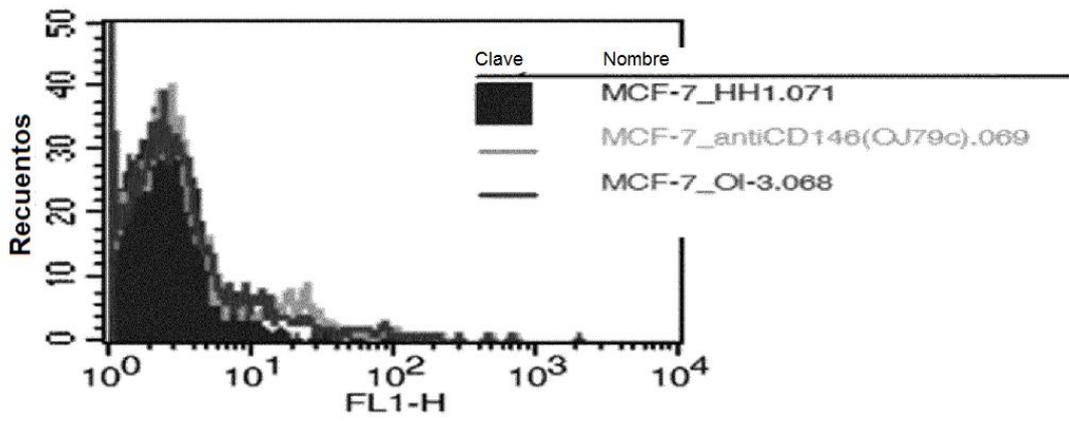
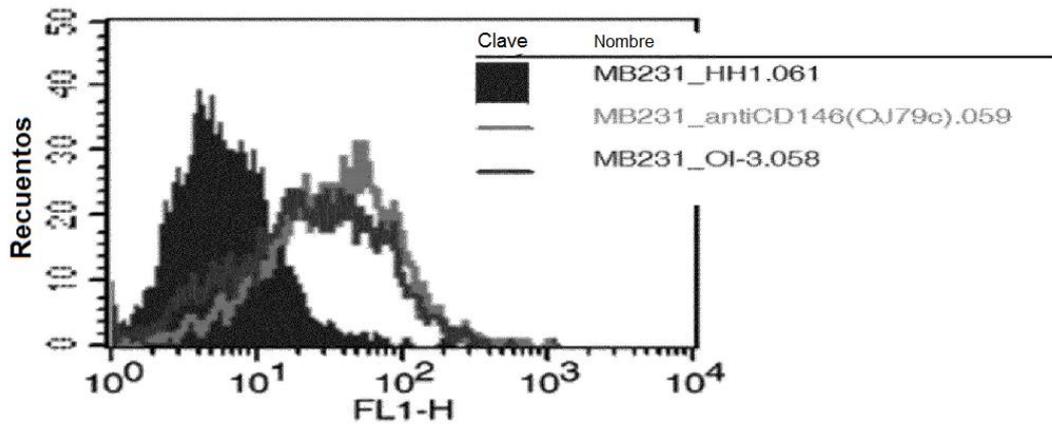


Figura 5
(continuación)

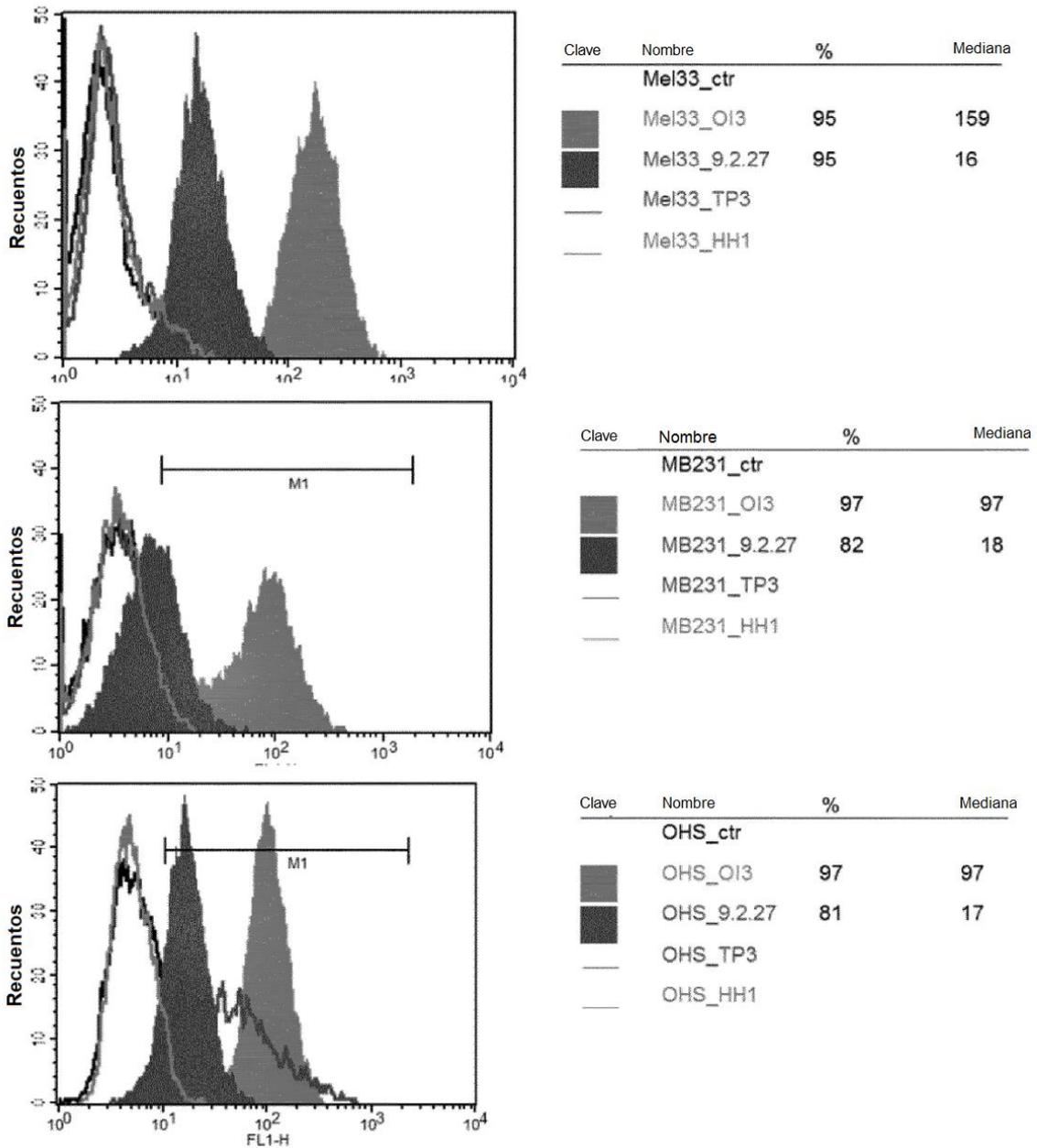


Figura 6

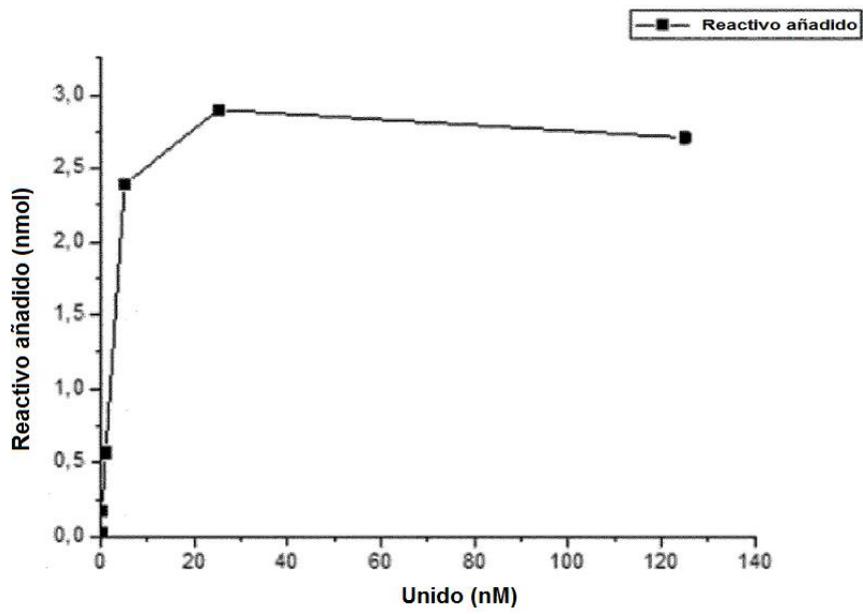
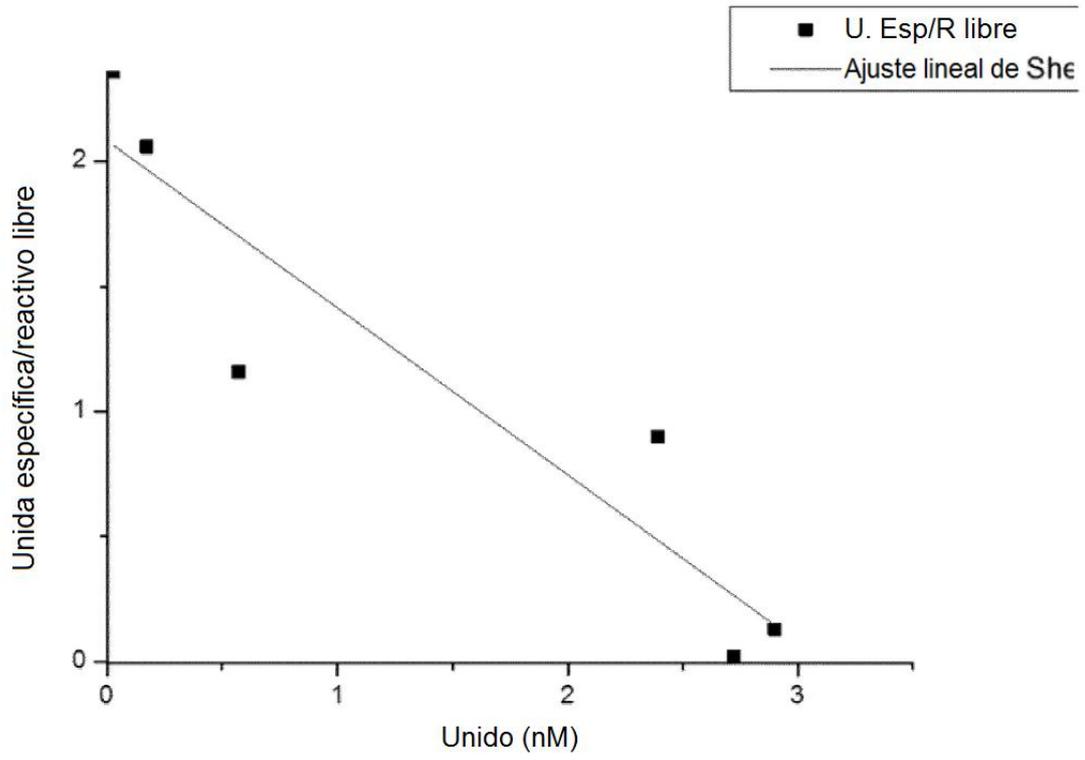
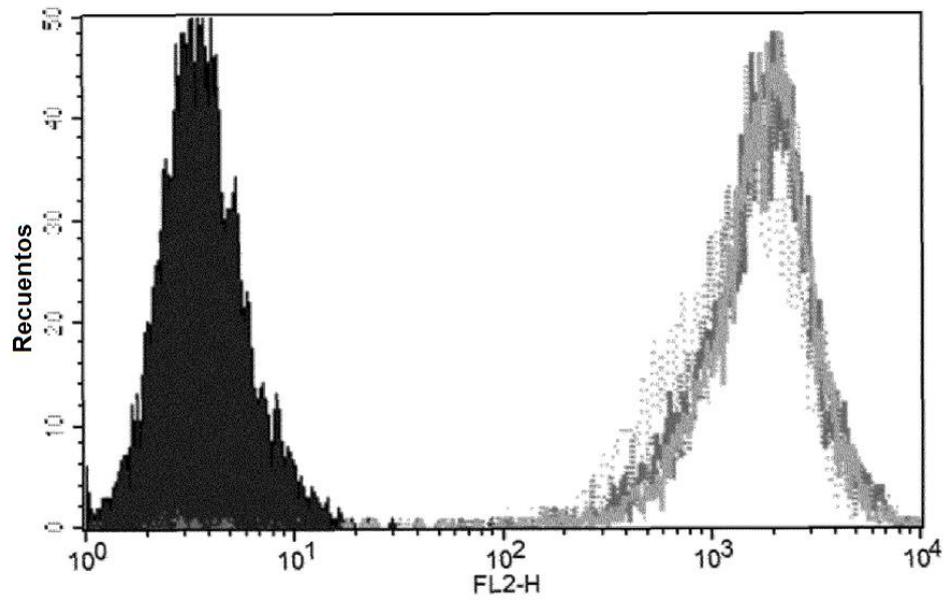


Figura 7



Clave	Nombre	Parámetro	Portal
■	Mel33_sec.ctr_antiHIgG.001	FL2-H	G1
—	Mel33_chOI3IgG1(20ug/ml).002	FL2-H	G1
.....	Mel33_chOI3IgG1(10ug/ml).003	FL2-H	G1
.....	Mel33_chOI3IgG1(5ug/ml).004	FL2-H	G1
—	Mel33_chOI3IgG3(20ug/ml).005	FL2-H	G1
.....	Mel33_chOI3IgG3(10ug/ml).006	FL2-H	G1
.....	Mel33_chOI3IgG3(5ug/ml).007	FL2-H	G1

Figura 8

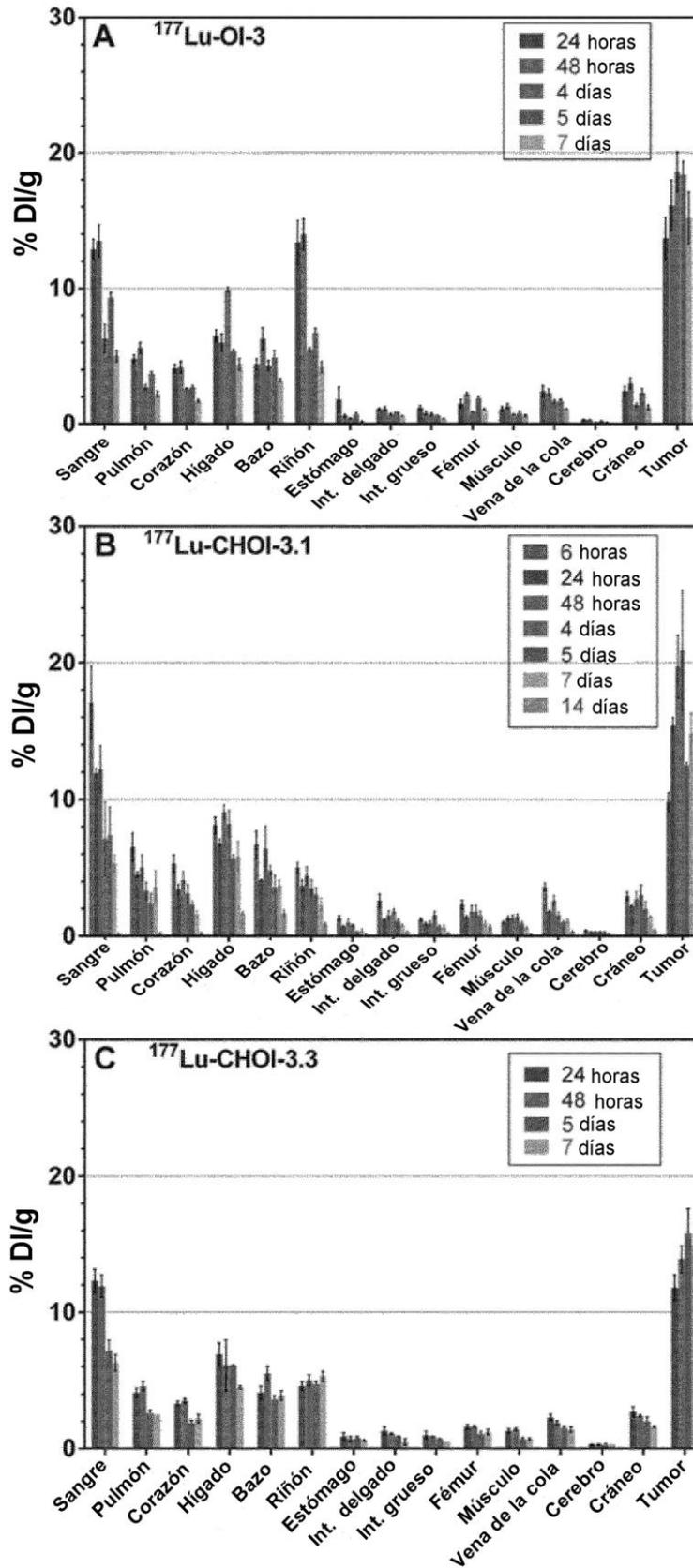


Figura 9

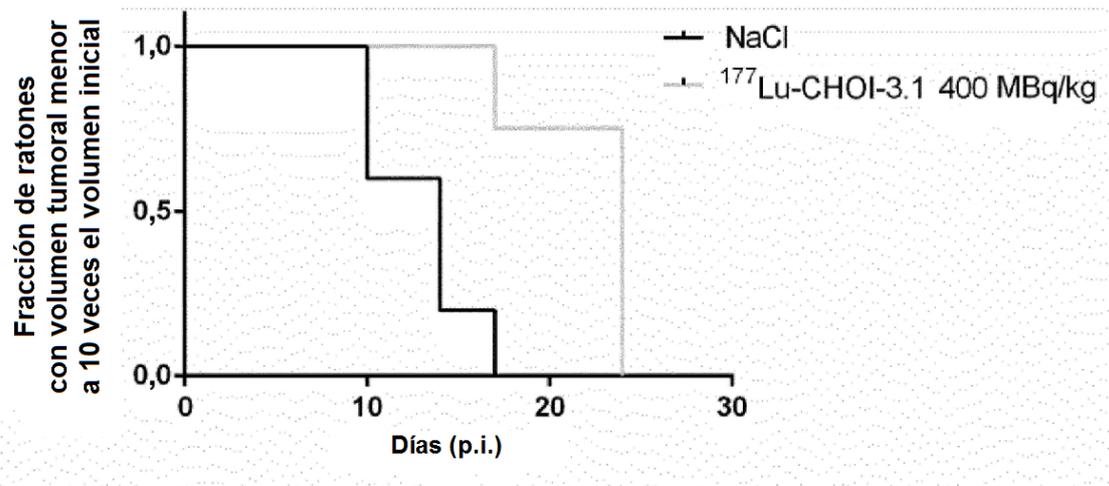


Figura 10