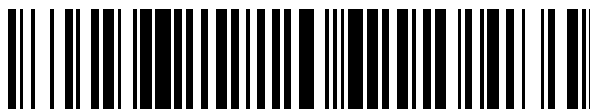


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 626**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30	(2006.01) C07K 16/06	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) C07K 16/28	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)	
G01N 33/53	(2006.01)	
G01N 33/534	(2006.01)	
G01N 33/574	(2006.01)	
G01N 33/577	(2006.01)	
C12P 21/08	(2006.01)	
A61K 51/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2009** **PCT/JP2009/007333**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011** **WO11080796**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009** **E 09852778 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 2519542**

54 Título: **Anticuerpos anti-CDH3 y sus usos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SHIBA, YASUHIRO;
YOSHIOKA, HIROKI;
YAMAMOTO, SHINJI;
KUDO, AIKO;
OHSAWA, RYUJI;
NG, POHSING;
NAKAMURA, YUSUKE y
ENDO, KEIGO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 701 626 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CDH3 y sus usos

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CDH3, métodos de prevención o tratamiento, o diagnóstico de una enfermedad asociada a CDH3 usando los anticuerpos, y composiciones farmacéuticas o kits de diagnóstico que comprenden los anticuerpos.

[Técnica anterior]

10 Las cadherinas son glucoproteínas de la adhesión célula-célula que forman empalmes intercelulares dependientes del calcio y desempeñan una función esencial en la morfogénesis y en el desarrollo y mantenimiento de tejidos y órganos adultos (NPL 1)). Durante la embriogénesis, la expresión celular de cadherinas específicas produce interacciones homófilas que son críticas en el proceso de la clasificación celular y la estratificación de tejidos (NPL 2-4). Las alteraciones en estas uniones celulares desempeñan una función importante en la desestabilización celular y pueden modificar el proceso de diferenciación cuidadosamente regulado de las estructuras epiteliales (NPL 5-6). Por este motivo, la pérdida funcional o expresión en exceso de cadherinas y los mecanismos moleculares que subyacen el control de los genes que codifican estas proteínas participan en la carcinogénesis (NPL 7).

15 La familia de las cadherinas se subdivide en diversas subfamilias, que incluyen las E-, P- y N-cadherinas clásicas, demostrando cada una una distribución en tejido específica (NPL 8). Aunque la E-cadherina se expresa en todos los tejidos epiteliales, la expresión de P-cadherina (CDH3) solo está limitada a las capas basales o inferiores de epitelios estratificados, que incluyen próstata y piel, y también a las células mioepiteliales de la mama (NPL 9-10).

20 Un conjunto importante de datos también revela ahora que la expresión anómala de la P-cadherina está asociada a proliferación celular y con tumores de colon, mama, pulmón, tiroides y cuello uterino (NPL 11-12). Se informó que la P-cadherina humana era el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal NCC-CAD-299 producido contra un carcinoma epidermoide vulvar (NPL 10). Se espera que la modulación de la adhesión y señalización intracelular mediada por P-cadherina produzca disminución en la proliferación y supervivencia de células tumorales *in vivo*. Por consiguiente, en vista de la función crucial que la P-cadherina parece poseer en proliferación celular y la progresión de tumores sólidos, se desea generar anticuerpos para P-cadherina que puedan proporcionar un beneficio terapéutico a pacientes con una variedad de cánceres.

30 Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales contra moléculas específicas para el cáncer son útiles en el tratamiento del cáncer (NPL 13). Además de ejemplos satisfactorios de aplicación clínica de los anticuerpos humanizados o quiméricos tales como trastuzumab (NPL 14), rituximab (NPL 15) y bevacizumab (NPL 16) para cáncer de mama, linfoma maligno y cáncer de colon, están en desarrollo varios anticuerpos monoclonales contra otras dianas moleculares y están siendo evaluadas sus actividades antitumorales. Se espera que estos anticuerpos monoclonales proporcionen una esperanza a los pacientes que tienen tumores que no tienen tratamiento eficaz. Una de las otras cuestiones importantes para estos anticuerpos monoclonales es el logro de efectos terapéuticos selectivos para células cancerosas sin grave toxicidad debido a su reacción específica con células que expresan moléculas diana (NPL 17-19, PTL 1-4). Los dominios variables de unión a ligando (V-mins) que tienen reordenación estructural del dominio de unión de inmunoglobulinas y otros miembros de unión a ligando de la superfamilia de las inmunoglobulinas se proporcionan por el documento WO 94/12625.

[Lista de referencias]

40 [Bibliografía de patente]

[PTL 1]

WO2002/097395

[PTL 2]

WO2004/110345

45 [PTL 3]

WO2006/114704

[PTL 4]

WO2007/102525

[Bibliografía no de patente]

50 [NPL 1]

Conacci-Sorrell M, et al., J Clin Invest, 109:987-91, (2002)
 [NPL 2]
 Nose A, et al., Cell, 54:993-1001, (1988)
 [NPL 3]
 5 Steinberg MS, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91:206-9, (1994)
 [NPL 4]
 Takeichi M. Science, 251:1451-5, (1991)
 [NPL 5]
 Daniel CW, et al., Dev Biol, 169:511-9, (1995)
 10 [NPL 6]
 Nose A and Takeichi M. J Cell Biol, 103:2649-58, (1986)
 [NPL 7]
 Behrens J. Cancer Metastasis Rev, 18:15-30 (1999)
 [NPL 8]
 15 Takeichi M. Development, 102:639-55(1988)
 [NPL 9]
 Takeichi M. J Cell Biol 103:2649-58, (1986)
 [NPL 10]
 Shimoyama Y, et al., Cancer Res, 49:2128-33(1989)
 20 [NPL 11]
 Gamallo, Modern Pathology, 14:650-654, (2001)
 [NPL 12]
 Stefansson, et al., J. Clin. Oncol. 22(7):1242-1252 (2004)
 [NPL 13]
 25 Harris, M. Lancet Oncol, 5: 292-302 (2004)
 [NPL 14]
 Baselga, J. Oncology, 61: SuuplSuupl 2 14-21 (2004)
 [NPL 15]
 Maloney, D.G., et al. Blood, 90: 2188-2195 (1997)
 30 [NPL 16]
 Ferrara, N., et al. Nat Rev Drug Discov, 3: 391-400 (2004)
 [NPL 17]
 Crist, W.M., et al. J Clin Oncol, 19: 3091-3102 (2001)
 [NPL 18]
 35 Wunder, J.S., et al. J Bone Joint Surg Am, 80: 1020-1033 (1998)
 [NPL 19]
 Ferguson, W.S. and Goorin, A.M. Cancer Invest, 19: 292-315 (2001)

[Sumario de la invención]

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales contra CDH3, que reconocen específicamente un polipéptido CDH3 tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, en la que el anticuerpo o su fragmento comprende una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18. La presente invención proporciona una evidencia de que los anticuerpos anti-CDH3 monoclonales marcados con ⁹⁰Y tienen efecto antitumoral significativo en ratones de xenoinjerto que llevan una línea de células cancerosas. La presente invención se define por las realizaciones como se engloban por las reivindicaciones. Así, se refiere a los siguientes puntos:

1. Un anticuerpo o su fragmento, en el que el anticuerpo o su fragmento comprende una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y en el que el anticuerpo o su fragmento es capaz de unirse a un polipéptido CDH3.

2. El anticuerpo o su fragmento según el punto 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo y anticuerpo monocatenario.

3. El anticuerpo o su fragmento según el punto 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

4. El anticuerpo o su fragmento según el punto 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

5. El anticuerpo o su fragmento según el punto 4, en el que el anticuerpo humanizado comprende además una región estructural (FR) de anticuerpo humano y/o una región constante (C) de anticuerpo humano.

6. El anticuerpo o su fragmento según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo.

7. El anticuerpo o su fragmento según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que el anticuerpo se conjuga con una marca fluorescente.

8. El anticuerpo o su fragmento según el punto 6, en el que la marca de radioisótopo se selecciona de ⁹⁰Y y ¹¹¹In.

9. El anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de los puntos 6 u 8 para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer.

10. Uso del anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de los puntos 6 u 8 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cáncer.

11. El anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de los puntos 1 a 8 para diagnosticar cáncer o la predisposición a desarrollar cáncer en el que dicho diagnóstico comprende:

(a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con dicho anticuerpo;

(b) detectar un polipéptido CDH3 en la muestra o espécimen; y

(c) juzgar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar cáncer basándose en la abundancia relativa del polipéptido CDH3 en comparación con un control.

12. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer, en el que la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de los puntos 6 u 8 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Un kit para su uso en el diagnóstico de cáncer, en el que el kit comprende el anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de los puntos 1 a 8.

La presente divulgación se refiere además a lo siguiente:

[1] Un anticuerpo o su fragmento, en el que el anticuerpo comprende una región V (variable) de la cadena H (pesada) y una región V de la cadena L (ligera), en el que la región V de las cadenas H y La región V de la cadena L se seleccionan del grupo que consiste en:

- 5 (a) una región V de la cadena H que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 12 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma;
- 10 (b) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma;
- 15 (c) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 44 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma; y
- 20 (d) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, 72, 76 u 80, o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma,

y en la que el anticuerpo es capaz de unirse a un polipéptido CDH3 o un péptido parcial del mismo.

- 25 En realizaciones típicas, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo y anticuerpo monocatenario.

- 30 [2] El anticuerpo o su fragmento de la presente invención se puede conjugar con un agente citotóxico, terapéutico, una marca de radioisótopo o una marca fluorescente. En realizaciones típicas, el anticuerpo se marca con una marca de radioisótopo. En realizaciones más típicas, la marca de radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en 90-itrío (^{90}Y), 125-yodo (^{125}I) y 111-indio (^{111}In).

[3] Un método de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a CDH3, o inhibición del crecimiento de células que expresan CDH3, en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o su fragmento de la presente invención.

- 35 [4] Un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad que está asociada a CDH3 o de una predisposición para desarrollar la enfermedad en un sujeto, que comprende

(a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con el anticuerpo o fragmento de la invención;

(b) detectar un polipéptido CDH3 en la muestra o espécimen; y

- 40 (c) determinar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar la enfermedad basándose en la abundancia relativa del polipéptido CDH3 en comparación con un control.

- 45 [5] Una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad asociada a CDH3, o inhibir el crecimiento de células que expresan CDH3, comprendiendo la composición una cantidad eficaz del anticuerpo o su fragmento de la presente invención, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[6] Un kit para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada a CDH3, comprendiendo el kit el anticuerpo o fragmento de la presente invención.

[Breve descripción de los dibujos]

[Fig. 1]

- 50 La Figura 1 muestra el efecto de los anticuerpos anti-CDH3 marcados con 90Y (clon #3, #4, #5 y #6) sobre el crecimiento tumoral. Los anticuerpos anti-CDH3 marcados con 90Y, en particular el clon #3, #4 y #6,

suprimieron eficazmente el crecimiento de células H1373 injertadas en ratones sin pelo, mientras que no se demostró supresión del crecimiento tumoral por administración de anticuerpos anti-CDH3 no marcados.

[Fig. 2]

La Figura 2 muestra el análisis de SDS-PAGE reducida de anticuerpos anti-CDH3 (clon #3, #4, #5 y #6). El patrón de bandas del clon #3, #4 y #5 reveló dos bandas correspondientes a la cadena pesada y cadena ligera de IgG, mientras que el del clon #6 reveló dos bandas de cadena pesada y una sola banda de cadena ligera.

[Descripción de realizaciones]

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CDH3, a composiciones que los comprenden y a su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a CDH3 tal como cáncer, en el que el anticuerpo o su fragmento comprende una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y en la que el anticuerpo o su fragmento es capaz de unirse a un polipéptido CDH3. En una realización típica, el anticuerpo se marca con una marca de radioisótopo.

Se ha informado de micromatrices de ADNc para el análisis de la expresión génica de células de cáncer pancreático y células normales recogidas de pacientes con cáncer pancreático (Nakamura et al., (2004) Oncogene; 23: 2385-400). Posteriormente se identificaron varios genes con expresión específicamente potenciada en células de cáncer pancreático. La cadherina placentaria (P-cadherina; CDH3), que es una proteína de la membrana citoplásmica, fue uno de estos genes y representó bajos niveles de expresión en los principales órganos. Dichas características son adecuadas para un gen diana para la terapia del cáncer debido a que se evitará el peligro de efectos secundarios. Además, se confirmó una expresión en exceso similar de CDH3 en otras líneas de células cancerosas, tales como las líneas de células de cáncer de pulmón, colorrectal, de próstata, mama, gástrico y de hígado (documento WO/2007/102525).

Definición

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

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

El término "funcionalmente equivalente" a las CDR, como se usa en el presente documento, se refiere a CDR que dan un anticuerpo que tiene sustancialmente la misma actividad de unión al antígeno y especificidad por antígenos contra el anticuerpo que tiene CDR originales. Ejemplos de funcionalmente equivalentes a las CDR incluyen aquellos en los que uno o más restos de aminoácidos están sustituidos, deletados, insertados y/o añadidos a las CDR originales. Mientras se mantienen la actividad de unión al antígeno y la especificidad por antígenos, el número o porcentaje de mutaciones de aminoácidos no están particularmente limitados. Sin embargo, generalmente se prefiere alterar 20 % o menos de la secuencia de aminoácidos de CDR originales incluidas en una región variable. Más preferentemente, el porcentaje de mutaciones es 15 % o menos, 10 % o menos, 5 % o menos. En una realización preferida, el número de mutaciones de aminoácidos es 10 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2

o menos, 1 o menos. Un experto en la materia entenderá mutaciones aceptables que retienen las propiedades de las CDR originales.

Producción de anticuerpos

5 La presente invención usa anticuerpos anti-CDH3 monoclonales. Estos anticuerpos se proporcionarán por métodos bien conocidos en la técnica.

Las técnicas a modo de ejemplo para la producción de los anticuerpos usados según la presente invención se describen a continuación.

(i) Anticuerpos monoclonales

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

15 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o resto no proteináceo mediante métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. N° 4.816.567).

20 En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster se inmuniza con un polipéptido CDH3 para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a polipéptidos CDH3. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar con un polipéptido CDH3 *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

25 Las células de hibridoma preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas puede incluir normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

30 Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas de células de mieloma preferidas incluyen líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

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

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión que entonces se transfectan en

células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

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

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

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

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

La presente invención proporciona anticuerpos adecuados para tratar y/o prevenir una enfermedad, y/o inhibir el crecimiento de células que expresan CDH3. La presente invención también proporciona anticuerpos adecuados para diagnosticar enfermedad asociada a CDH3. En la presente invención, los anticuerpos monoclonales murinos clon #3, #4 y #5 se establecen satisfactoriamente y se demostró que estos anticuerpos, en particular el clon #3, suprimían eficazmente el crecimiento de células que expresan CDH3 (por ejemplo, células cancerosas). Además, éstos no tienen sitios de glucosilación dentro de sus regiones variables. Esta propiedad es una ventaja para el desarrollo de fármacos terapéuticos puesto que puede soportar la uniformidad del anticuerpo.

Por tanto, en la presente invención, se establecen satisfactoriamente variantes, que no tienen sitios de glucosilación, del clon #6. El clon #6 se ha demostrado como un anticuerpo que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de diversas células que expresan CDH3, sin embargo, tiene un sitio de glucosilación dentro de CDR2 de la región V de la cadena H. Las variantes de la presente invención cambian un resto de asparagina del sitio de glucosilación a un resto de serina, treonina, alanina o glutamina.

Las secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena H de anticuerpos monoclonales de ratón clon #3, clon #4 y #5 se muestran en SEQ ID NO: 4, 20, 36, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena L de anticuerpos monoclonales de ratón clon #3, clon #4 y #5 se muestran en SEQ ID NO: 12, 28, 44, respectivamente. Además, las secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena H de las variantes del clon #6 se muestran en SEQ ID NO: 68, 72, 76 y 80, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena L de las variantes del clon #6 se muestran en SEQ ID NO: 60.

Las CDR incluidas en una región V de la cadena H y una región V de la cadena L se pueden determinar según métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos descritos por Kabat et al. (Kabat E. A. et al. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest. 5ª Edición) o Chothia et al. (Chothia et al. J. Mol. Biol. (1987) 196; 901-917) se usan generalmente para la determinación de CDR.

Por tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos o sus fragmentos, que comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, en los que la región V de las cadenas H y La región V de la cadena L se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y

una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma;

(b) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma;

(c) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma; y

(d) una región V de la cadena H que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, 72, 76 u 80, o CDR funcionalmente equivalentes a la misma, y una región V de la cadena L que comprende CDR incluidas en una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 60 o CDR funcionalmente equivalentes a la misma,

y en la que el anticuerpo es capaz de unirse a un polipéptido CDH3 o un péptido parcial del mismo.

En realizaciones preferidas, las CDR se pueden determinar por la definición de Kabat (Kabat E. A. et al. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest. 5ª edición). Las CDR de cada clon determinado por la definición de Kabat se describen a continuación.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR del clon #3 son CDR1: SFWIH (SEQ ID NO: 6), CDR2: NIDPSDSETHYNQYFKD (SEQ ID NO: 8) y CDR3: GGTGFSS (SEQ ID NO: 10) en la región V de la cadena H, y CDR1: KASQDIDSYLS (SEQ ID NO: 14), CDR2: RANRLVD (SEQ ID NO: 16) y CDR3: LQYDEFPRT (SEQ ID NO: 18) en la región V de la cadena L.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR del clon #4 son CDR1: SYWMH (SEQ ID NO: 21), CDR2: NIDPSDSETHYNQNFND (SEQ ID NO: 24) y CDR3: GGTGFAY (SEQ ID NO: 26) en la región V de la cadena H, y CDR1: KASQDINNYLG (SEQ ID NO: 30), CDR2: RTDLRIE (SEQ ID NO: 32) y CDR3: LQYDEFPRM (SEQ ID NO: 34) en la región V de la cadena L.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR del clon #5 son CDR1: SYWMH (SEQ ID NO: 38), CDR2: NIDPSDSETHYNQKFNDRA (SEQ ID NO: 40) y CDR3: GGTGFAY (SEQ ID NO: 42) en la región V de la cadena H, y CDR1: KASQDINNYLG (SEQ ID NO: 46), CDR2: RTDLRIE (SEQ ID NO: 48) y CDR3: LQYDEFPRM (SEQ ID NO: 50) en la región V de la cadena L.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de variantes del clon #6 son CDR1: SYWIH (SEQ ID NO: 54), CDR2: EIDPSDSYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 70), EIDPSDTYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 74), EIDPSDAYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 78) o EIDPSDQYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 82) y CDR3: SGYGNLFVY (SEQ ID NO: 58) en la región V de la cadena H, y CDR1: SATSSVTYMY (SEQ ID NO: 62), CDR2: RTSNLAS (SEQ ID NO: 64) y CDR3: QHYHIYPRT (SEQ ID NO: 66) en la región V de la cadena L.

Por tanto, la presente divulgación también proporciona anticuerpos o sus fragmentos, en la que los anticuerpos comprende una región V de la cadena H y una región V de la cadena L, en la que la región V de las cadenas H y La región V de la cadena L se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18;

(b) una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34;

(c) una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 40 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 46, CDR2 que tiene la secuencia de

aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 50; y

(d) una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 54, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, 74, 78 u 82 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66.

Un ejemplo de la región V de la cadena H (VH) en la "región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10" anteriormente mencionada es una VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4. Un ejemplo de la región V de la cadena L (VL) en la "región V de la cadena L anteriormente mencionadas que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8" es una VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12.

Un ejemplo de la VH en la "región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 " anteriormente mencionada es una VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20. Un ejemplo de la VL en the anteriormente mencionadas "la región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34" es una VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28.

Un ejemplo de la VH en la "región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 40 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42" anteriormente mencionada es una VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36. Un ejemplo de la VL en la "región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 46, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 50" anteriormente mencionada es una VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44.

Un ejemplo de la VH en la "región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 54, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, 74, 78 u 82 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58" anteriormente mencionada es una VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, 72, 76 u 80. Un ejemplo de la VL en la "región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 62, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 64 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 66" anteriormente mencionada es una VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60.

Por tanto, en una realización, la presente divulgación proporciona los anticuerpos o sus fragmentos, en la que el anticuerpo comprende una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20, 36, 68, 72, 76 y 80 y/o una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28, 44 y 60.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la presente invención comprenden:

(a) una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12;

(b) una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 y una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28;

(c) una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 36 y una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44; o

(d) una región V de la cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, 72, 76 u 80 y una región V de la cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar por métodos convencionales. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden preparar integrando un polipéptido que codifica el polipéptido de anticuerpo en un vector adecuado, introduciendo el vector en un hospedador y produciendo el anticuerpo del hospedador según una técnica

de recombinación genética convencional (véase, por ejemplo, Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-75).

Las secuencias de ácidos nucleicos de los polinucleótidos que codifican las regiones V de los anticuerpos de la presente invención se pueden deducir de las secuencias de aminoácidos de las regiones V de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en SEQ ID NO: 3 y 11 se pueden usar como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH y VL del clon #3, respectivamente. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en SEQ ID NO: 19 y 27 se pueden usar como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH y VL del clon #4, respectivamente. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en SEQ ID NO: 35 y 43 se pueden usar como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la VH y VL del clon #5, respectivamente. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en SEQ ID NO: 67, 71, 75 o 79, y 59 se pueden usar como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la VH y VL de variantes del clon #6, respectivamente. Los polinucleótidos que codifican la región V de los anticuerpos de la presente invención se pueden sintetizar basándose en la información de secuencias por métodos convencionales tales como las técnicas en fase sólida (Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron (1992) 48, 2223-311; Matthes et al., EMBO J (1984) 3, 801-5) y técnicas de síntesis de oligonucleótidos (Jones et al. Nature (1986) 321, 522-5).

El polinucleótido que codifica la región V del anticuerpo se integra en un vector de expresión que contiene el polinucleótido que codifica la región constante (C) del anticuerpo. Para la producción del anticuerpo usado en la presente invención, el polipéptido que codifica el anticuerpo (gen de anticuerpo) se integra en un vector de expresión de manera que el gen de anticuerpo se pueda expresar bajo el control de elementos de control de la expresión (por ejemplo, potenciador, promotor). Una célula hospedadora se transforma con el vector de expresión para expresar el anticuerpo.

En la expresión del gen de anticuerpo, el polinucleótido que codifica la cadena H y el polinucleótido que codifica la cadena L del anticuerpo se pueden integrar en vectores de expresión separados, y entonces una célula hospedadora se co-transforma con los vectores de expresión recombinantes resultantes. Alternativamente, tanto el polinucleótido que codifica la cadena H como el polinucleótido que codifica la cadena L del anticuerpo se pueden integrar juntos en un único vector de expresión, y entonces una célula hospedadora se transforma con el vector de expresión recombinante resultante (por ejemplo, el documento WO 94/11523).

El gen de anticuerpo se puede expresar por métodos conocidos. Para la expresión en una célula de mamífero, se puede unir operativamente un promotor útil convencional, el gen de anticuerpo que se va a expresar y una señal poli(A) (localizada en la dirección 3' con respecto al extremo 3' del gen de anticuerpo). Por ejemplo, como sistema de promotor/potenciador útil, se puede usar un sistema de promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano. También se puede usar para la expresión del anticuerpo en la presente invención otros sistemas de promotor/potenciador, por ejemplo, los derivados de virus (por ejemplo, retrovirus, virus del poliovirus, adenovirus y virus 40 simio (SV40)) y los derivados de células de mamífero (por ejemplo, factor 1 alfa de elongación humano (HEF1 alfa)). Cuando se usa el sistema de promotor/potenciador de SV40, la expresión génica se puede realizar fácilmente por el método de Mulligan et al. (Nature (1979) 277, 108-14). Cuando se usa el sistema de promotor/potenciador de HEF1 alfa, la expresión génica se puede realizar fácilmente por el método de Mizushima et al. (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

Para la expresión en *E. coli*, se puede unir operativamente un promotor útil convencional, una secuencia señal para secretar el anticuerpo de interés y el gen de anticuerpo. Como promotor, se puede usar el promotor lacZ o promotor araB. Cuando se usa el promotor lacZ, la expresión génica se puede realizar por el método de Ward et al. (Nature (1998) 341, 544-6; FASEB J. (1992) 6, 2422-7), mientras que cuando se usa el promotor araB, la expresión génica se puede realizar por el método de Better et al. (Science (1988) 240, 1041-3).

Con respecto a la secuencia señal para la secreción del anticuerpo, cuando se pretende que el anticuerpo de interés secrete en el espacio periplásmico de *E. coli*, se puede usar la secuencia señal de pelB (Lei, S.P. et al, J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-83). Se aísla el anticuerpo secretado en el espacio periplásmico y entonces se repliega de manera que el anticuerpo adopte una configuración apropiada.

Se puede usar el origen de replicación derivado de virus {por ejemplo, SV40, virus del poliovirus, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV)} o similares. Para aumentar el número de copias de gen en el sistema de célula hospedadora, el vector de expresión puede contener además un gen marcador selectivo, tal como una gen de aminoglucósido fosfotransferasa (APH), un gen de timidina cinasa (TK), un gen de xantina-guanina fosforribosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt) y un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr). Para la producción del anticuerpo usado en la presente invención, se pueden usar cualquier sistema de expresión que incluye sistemas de células eucariotas y procariotas. La célula eucariota incluye líneas celulares establecidas de animales (por ejemplo, mamíferos, insectos, mohos y hongos, levadura). La célula procariota incluye células bacterianas tales como células de *E. coli*. Es preferible que el anticuerpo usado en la presente invención se exprese en una célula de mamífero, tal como una célula CHO, COS, de mieloma, BHK, Vero y HeLa.

A continuación, la célula hospedadora transformada se cultiva *in vitro* o *in vivo* para producir el anticuerpo de interés. El cultivo de la célula hospedadora se puede realizar por cualquier método conocido. El medio de cultivo que se

puede usar en el presente documento puede ser medio DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM. El medio de cultivo puede contener un suplemento de suero, tal como suero bovino fetal (FCS).

En la producción del anticuerpo recombinante, además de las células hospedadoras anteriormente mencionadas, también se puede usar un animal transgénico no humano como hospedador. Por ejemplo, el gen de anticuerpo se inserta en un sitio predeterminado de un gen que codifica una proteína inherentemente producida en la leche de un animal (por ejemplo, beta-caseína) para preparar un gen de fusión. Se inyecta un fragmento de ADN que contiene el gen de fusión introducido en el gen de anticuerpo en un embrión de un animal no humano, y el embrión se introduce entonces en un animal hembra. El animal hembra que tiene el embrión en su interior pare un animal transgénico no humano. El anticuerpo de interés es secretado en la leche del animal transgénico no humano o su progenie. Con el fin de aumentar la cantidad de leche que contiene anticuerpo, se puede administrar una hormona apropiada al animal transgénico (Ebert, K.M. et al, Bio/Technology (1994) 12, 699-702.).

El anticuerpo expresado y producido como se ha descrito anteriormente se puede aislar de las células o el cuerpo del animal hospedador y purificar. El aislamiento y la purificación del anticuerpo usado en la presente invención se pueden realizar en una columna de afinidad. También se pueden usar otros métodos convencionalmente usados para el aislamiento y la purificación de un anticuerpo; así, el método no está particularmente limitado. Por ejemplo, se pueden usar diversas cromatografías, filtración, ultrafiltración, precipitación por sales y diálisis individualmente o en combinación para aislar y purificar el anticuerpo de interés (Antibodies A Laboratory Manual. Ed. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

(ii) Anticuerpo quimérico y anticuerpo humanizado

En la presente invención, se puede usar un anticuerpo recombinante artificialmente modificado, que incluye un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. Estos anticuerpos modificados se pueden preparar por cualquier método conocido. Por ejemplo, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (1984) 81: 6851-5; Neuberger et al., Nature (1984), 312: 604-8; Takeda et al., Nature (1985) 314: 452-4).

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies de animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, "anticuerpos humanizados".

Un anticuerpo quimérico según la presente invención se puede preparar uniendo el ADN que codifica la región V del anticuerpo a ADN que codifica una región C del anticuerpo humano, integrando el producto de unión en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión recombinante resultante en un hospedador para producir el anticuerpo quimérico.

Un anticuerpo humanizado también se denomina "anticuerpo humano reformado", en el que las CDR de un anticuerpo de un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón) se injertan en las de un anticuerpo humano. También se conoce el procedimiento general de recombinación genética para producir dicho anticuerpo humanizado (por ejemplo, documentos EP 125023; WO 96/02576).

Específicamente, se diseña una secuencia de ácidos nucleicos en la que las CDR del anticuerpo de ratón se unen mediante regiones estructurales (FR), y se sintetiza por un método de PCR usando varios oligonucleótidos como cebadores que se diseñaron para tener regiones que se solapan con las regiones terminales de las CDR y las FR. El ADN resultante se une a ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, y el producto de unión se integra en un vector de expresión. El vector de expresión recombinante resultante se introduce en un hospedador, produciendo así el anticuerpo humanizado (por ejemplo, documento WO 96/02576).

Las FR unidas mediante las CDR se seleccionan de manera que las CDR puedan formar un sitio de unión funcional al antígeno. Si fuera necesario, se puede sustituir un aminoácido(s) en las FR de la región V del anticuerpo de manera que las CDR del anticuerpo humano remodelado puedan formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-6.).

El anticuerpo quimérico está compuesto por regiones V derivadas de un anticuerpo de mamífero no humano y regiones C derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado está compuesto por CDR y FR derivadas de un anticuerpo de mamífero no humano y regiones C derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado puede ser útil para uso clínico, debido a que se reduce la antigenicidad del anticuerpo contra un cuerpo humano. Un ejemplo específico de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado usado en la presente invención es un anticuerpo en el que las regiones V derivan del anticuerpo monoclonal de ratón clon #3, #4, #5 o variantes del clon #6, o un anticuerpo en el que las CDR derivan del anticuerpo monoclonal de ratón clon #3, #4, #5 o variantes del clon #6. El método para producir dichos anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados se describe a continuación.

Por ejemplo, primero, se preparan los genes que codifican las regiones V o CDR de los anticuerpos del clon #3, #4, #5 o variantes del clon #6 a partir de los ARN de células productoras de anticuerpos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o tales (véase, por ejemplo, Larrick et al., "Methods: a Companion to Methods in Enzymology",

- Vol. 2: 106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application; Ritter et al. (eds.), página 166, Cambridge University Press, 1995, y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications; y Birch et al. (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc., 1995). Los polinucleótidos que codifican las regiones V o CDR de los anticuerpos se pueden sintetizar por técnicas de síntesis de oligonucleótidos (por ejemplo, Jones et al. Nature (1986) 321, 522-5). Entonces, los productos amplificados o sintetizados se someten a electroforesis en gel de agarosa según procedimientos convencionales, y los fragmentos de ADN de interés se escinden, recuperan, purifican y ligan a un ADN de vector.
- El ADN y ADN de vector obtenidos se pueden unir usando un kit de unión conocido para construir un vector recombinante. Se puede preparar un ADN de vector en un método conocido: J. Sambrook, et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. El ADN de vector se digiere con enzima(s) de restricción, y la secuencia de nucleótidos de un ADN deseado se puede determinar por un método conocido o usando un secuenciador automatizado.
- Una vez se clonan los fragmentos de ADN que codifican las regiones V de la cadena L y H del anticuerpo monoclonal de ratón (en lo sucesivo, la cadena L o H de un anticuerpo se puede denominar algunas veces "cadena L o H de ratón" para los anticuerpos de ratón y "cadena L o H humana" para los anticuerpos humanos), se unen y expresan los ADN que codifican las regiones V de ratón y los ADN que codifican las regiones C de anticuerpo humano dando anticuerpos quiméricos.
- Un método convencional para preparar los anticuerpos quiméricos implica unir una secuencia señal de ratón y secuencia de la región V presente en un ADNc clonado con una secuencia que codifica una región C de anticuerpo humano ya presente en un vector de expresión de una célula de mamífero. Alternativamente, se unen una secuencia señal de ratón y la secuencia de la región V presente en un ADNc clonado a una secuencia que codifica una región C de anticuerpo humano, seguido por unión a un vector de expresión en células de mamífero.
- El polipéptido que comprende la región C de anticuerpo humano C puede ser cualquiera de las regiones C de la cadena H o L de los anticuerpos humanos, que incluyen, por ejemplo, C gamma 1, C gamma 2, C gamma 3 o C gamma 4 para las cadenas H o C lambda humanas o C kappa para las cadenas L. Para preparar un anticuerpo quimérico, se construyen primero dos vectores de expresión; es decir, se construyen un vector de expresión que contiene ADN que codifican la región V de la cadena L de ratón y la región C de la cadena L humana bajo el control de un elemento de control de la expresión tal como un sistema de potenciador/promotor, y un vector de expresión que contiene ADN que codifican la región V de la cadena H de ratón y la región C de la cadena H humana bajo el control de un elemento de control de la expresión tal como un sistema de potenciador/promotor. Entonces, se cotransforman las células hospedadoras, tales como células de mamífero (por ejemplo, célula COS), con estos vectores de expresión y las células transformadas se cultivan *in vitro* o *in vivo* para producir un anticuerpo quimérico (véase, por ejemplo, el documento WO91/16928).
- Alternativamente, la secuencia señal de ratón presente en los ADNc y ADN clonados que codifican la región V de la cadena L de ratón y la región C de la cadena L humana, así como la secuencia señal de ratón y los ADN que codifican la región V de la cadena H de ratón y la región C de la cadena H humana, se introducen en un único vector de expresión (véase, por ejemplo, el documento WO94/11523) y dicho vector se usa para transformar una célula hospedadora; entonces, el hospedador transformado se cultiva *in vivo* o *in vitro* para producir un anticuerpo quimérico deseado. El vector para la expresión de la cadena H de un anticuerpo quimérico se puede obtener introduciendo ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H de ratón (también denominada en lo sucesivo "ADNc para la región V de la cadena H") en un vector de expresión adecuado que contiene el ADN genómico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región C de la cadena H de anticuerpo humano (también denominado en lo sucesivo "ADN genómico para la región C de la cadena H") o ADNc que codifica la región (también denominado en lo sucesivo "ADNc para la región C de la cadena H"). La región C de la cadena H incluye, por ejemplo, las regiones C gamma 1, C gamma 2, C gamma 3 o C gamma 4.
- Los vectores de expresión que tienen el ADN genómico que codifica la región C de la cadena H, en particular, los que codifican la región C gamma 1, incluyen, por ejemplo, HEF-PMh-g gamma 1 (documento WO92/19759) y DHER-INCREMENT E-RVh-PMI-f (documento WO92/19759). Alternativamente, se puede preparar la biblioteca de la región C humana usando ADNc de CMSP humanas (células mononucleares de sangre periférica) como se describió previamente (Liu, A. Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 3439-43, 1987; Reff, M.E. et al., Blood, Vol. 83, Nº 2, 435-45, 1994). Cuando los ADNc que codifican la región V de la cadena H de ratón se insertan en estos vectores de expresión, se puede introducir una secuencia de ácidos nucleicos apropiada en el ADNc mediante el método de PCR. Por ejemplo, la PCR se puede efectuar usando un cebador de PCR que se diseña de forma que el ADNc tenga una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción adecuada en su extremo 5' y secuencia consenso de Kozak inmediatamente antes de su codón de iniciación para mejorar la eficiencia de transcripción, así como un cebador de PCR que se diseña de forma que dicho ADNc tenga una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción adecuada en su extremo 3' y un sitio donante de corte y empalme para cortar y empalmar apropiadamente los productos de transcripción primarios del ADN genómico para dar un ARNm, para introducir estas secuencias de ácidos nucleicos apropiadas en el vector de expresión.

El ADNc construido que codifica la región V de la cadena H de ratón se puede tratar con una enzima(s) de restricción adecuada(s), entonces se inserta en el vector de expresión para construir un vector de expresión de cadena H quimérico que contiene el ADN de genoma que codifica la región C de la cadena H (región C gamma 1). Alternativamente, el ADNc construido que codifica la región V de la cadena H de ratón se puede tratar con una enzima(s) de restricción adecuada(s), unir a ADNc que codifica la región C de la cadena HC gamma 1, e insertar en un vector de expresión tal como pQCXIH (Clontech) para construir un vector de expresión que contiene el ADNc que codifica una cadena H quimérica.

El vector para la expresión de la cadena L de un anticuerpo quimérico se puede obtener ligando un ADNc que codifica la región V de la cadena L de ratón y un ADN genómico o ADNc que codifica la región C de la cadena L de un anticuerpo humano e introduciendo en un vector de expresión adecuado. La región C de la cadena L incluye, por ejemplo, cadena kappa y cadena lambda. Cuando se construye un vector de expresión que contiene ADNc que codifica la región V de la cadena L de ratón, se pueden introducir secuencias de ácidos nucleicos apropiadas tales como una secuencia de reconocimiento o secuencia consenso de Kozak en dicho vector de expresión mediante método de PCR.

Toda la secuencia de ácidos nucleicos de ADNc que codifica la región C de la cadena L lambda humana se puede sintetizar por un sintetizador de ADN y construir mediante el método de PCR. La región C de la cadena L lambda humana se conoce por tener al menos 4 isotipos diferentes y se puede usar cada isotipo para construir un vector de expresión. Se pueden ligar el ADNc construido que codifica la región C de la cadena L lambda humana y el ADNc anteriormente construido que codifica la región V de la cadena L de ratón entre sitios adecuados de enzimas de restricción e insertar en un vector de expresión tal como pQCXIH (Clontech), para construir un vector de expresión que contiene ADNc que codifica una cadena L lambda de un anticuerpo quimérico. El ADN que codifica la región C de la cadena L kappa humana que se une al ADN que codifica la región V de la cadena L de ratón se puede construir a partir de, por ejemplo, HEF-PM1 k-gk que contiene el ADN genómico (véase el documento WO92/19759). Alternativamente, la biblioteca de la región C humana se puede preparar usando ADNc de CMSP humanas (células mononucleares de sangre periférica) como se describió previamente (Liu, A. Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 3439-43, 1987; Reff, M.E. et al., Blood, Vol. 83, Nº 2, 435-45, 1994).

Se pueden introducir secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción adecuadas, mediante el método de PCR, en los extremos 5' y 3' de ADN que codifican la región C de la cadena L kappa, y se puede unir entre sí el ADN que codifica la región V de la cadena L de ratón como se construyó anteriormente y el ADN que codifica la región C de la cadena L kappa e insertar en un vector de expresión tal como pQCXIH (Clontech) para construir un vector de expresión que contiene ADNc que codifica la cadena L kappa de un anticuerpo quimérico.

La humanización de anticuerpos no humanos se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por secuencias de CDR.

Para preparar un anticuerpo humanizado en el que la CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injerta en un anticuerpo humano, se desea que exista una alta homología entre la FR del anticuerpo monoclonal de ratón y la FR del anticuerpo humano. Por consiguiente, se hace una comparación entre las regiones V de las cadenas H y L del anticuerpo monoclonal de ratón clon #3, #4, #5 o variantes del clon #6, y las regiones V de todos los anticuerpos conocidos cuyas estructuras se han esclarecido con el uso de Protein Data Bank. Además, se comparan simultáneamente con los subgrupos de anticuerpos humanos (HSG: subgrupo humano) clasificados por Kabat et al. basándose en la longitud de FR del anticuerpo, la homología de aminoácidos, y similares (Kabat, E.A. et al, US Dep, Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991).

La primera etapa para diseñar ADN que codifica una región V de anticuerpo humanizado es seleccionar una región V de anticuerpo humano como base para el diseño. Por ejemplo, se puede usar FR de una región V de anticuerpo humano que tiene una homología superior a 80 % con FR de una región V de anticuerpo de ratón en la producción de un anticuerpo humanizado.

En el anticuerpo humanizado, la región C y las regiones estructurales (FR) de la región V del anticuerpo se originan de humano y las CDR de la región V se originan de ratón. Se puede producir un polipéptido que comprende la región V del anticuerpo humanizado en la forma llamada injerto de CDR por el método de PCR, mientras que un fragmento de ADN de un anticuerpo humano estaría disponible como molde. El "injerto de CDR" se refiere a un método en el que se prepara un fragmento de ADN que codifica CDR derivadas de ratón y se sustituye las CDR de un anticuerpo humano como molde. Si no está disponible un fragmento de ADN de un anticuerpo humano que se va a usar como molde, se puede sintetizar una secuencia de ácidos nucleicos registrada en una base de datos en un sintetizador de ADN y se puede producir un ADN para una región V de un anticuerpo humanizado por el método de PCR. Además, cuando solo se registra una secuencia de aminoácidos en la base de datos, toda la secuencia de ácidos nucleicos se puede deducir de la secuencia de aminoácidos basándose en el conocimiento de uso de codones en anticuerpos como se informa por Kabat, E. A. et al. en US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991. Esta secuencia de ácidos nucleicos se sintetiza en un sintetizador de ADN y se puede preparar un ADN de una región V de anticuerpo humanizado por el método de PCR e introducir en un hospedador adecuado, seguido por

su expresión para producir el polipéptido deseado. Los procedimientos generales de injerto de CDR por el método de PCR se describen a continuación cuando está disponible un fragmento de ADN de un anticuerpo humano como molde.

Primero, se sintetizan fragmentos de ADN derivados de ratón correspondientes a CDR respectivas. Las CDR 1 a 3 se sintetizan basándose en las secuencias de ácidos nucleicos de las regiones V de las cadenas H y L de ratón previamente clonadas. Por ejemplo, cuando se produce un anticuerpo humanizado basándose en el clon #3 de anticuerpo monoclonal de ratón, las secuencias de CDR de la región V de la cadena H pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 (VH CDR1), 8 (VH CDR2) y 10 (VH CDR3); y las secuencias de CDR de la región V de la cadena L pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 14 (VL CDR1), 16 (VL CDR2) y 18 (VL CDR3). Cuando se produce un anticuerpo humanizado basándose en el clon #4 de anticuerpo monoclonal de ratón, las secuencias de CDR de la región V de la cadena H pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 22 (VH CDR1), 24 (VH CDR2) y 26 (VH CDR3); y las secuencias de CDR de la región V de la cadena L pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 30 (VL CDR1), 32 (VL CDR2) y 34 (VL CDR3). Cuando se produce un anticuerpo humanizado basado en el clon #5 de anticuerpo monoclonal de ratón, las secuencias de CDR de la región V de la cadena H pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 38 (VH CDR1), 40 (VH CDR2) y 42 (VH CDR3); y las secuencias de CDR de la región V de la cadena L pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 46 (VL CDR1), 48 (VL CDR2) y 50 (VL CDR3). Cuando se produce un anticuerpo humanizado basado en las variantes de anticuerpo monoclonal de ratón del clon #6, las secuencias de CDR de la región V de la cadena H pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 54 (VH CDR1), 70, 74, 78 u 82 (VH CDR2) y 66 (VH CDR3); y las secuencias de CDR de la región V de la cadena L pueden ser las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 62 (VL CDR1), 64 (VL CDR2) y 66 (VL CDR3).

El ADN para la región V de la cadena H de un anticuerpo humanizado se puede unir al ADN para cualquier región C de la cadena H de anticuerpo humano, por ejemplo, región C gamma 1 de la cadena H humana. Como se ha mencionado anteriormente, el ADN para la región V de la cadena H se puede tratar con una enzima de restricción adecuada y unir a ADN que codifica una región C de la cadena H humana bajo un elemento de control de la expresión, tal como un sistema de potenciador/promotor para preparar un vector de expresión que contiene ADN para una región V de la cadena H humanizada y una región C de la cadena H humana.

El ADN para la región V de la cadena L de un anticuerpo humanizado se puede unir a ADN para cualquier región C de la cadena L de anticuerpo humano, por ejemplo, la región C lambda de la cadena L humana. El ADN para la región V de la cadena L se puede tratar con una enzima de restricción adecuada y unir a un ADN que codifica una región C de la cadena L lambda humana bajo un elemento de control de la expresión tal como un sistema de potenciador/promotor para preparar un vector de expresión que contiene ADN que codifican una región V de la cadena L humanizada y una región C de la cadena L lambda humana. El ADN que codifica la región V de la cadena H de un anticuerpo humanizado y una región C de la cadena H humana y el ADN que codifica una región V de la cadena L humanizada y la región C de la cadena L humana también se pueden introducir en un único vector de expresión, tal como el desvelado en el documento WO94/11523, dicho vector se puede usar para transformar una célula hospedadora, y el hospedador transformado se puede cultivar *in vivo* o *in vitro* para producir un anticuerpo humanizado deseado.

Para producir un anticuerpo quimérico o humanizado, se deben preparar dos vectores de expresión como se mencionó anteriormente. Así, con respecto a un anticuerpo quimérico, se construyen un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una región V de la cadena H de ratón y una región C de la cadena H humana bajo el control de un elemento de control de la expresión tal como un potenciador/promotor, y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una región V de la cadena L de ratón y una región C de la cadena L humana bajo el control de un elemento de control de la expresión. Con respecto a un anticuerpo humanizado, se construyen un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una región V de la cadena H humanizada y una región C de la cadena H humana bajo el control de un elemento de control de la expresión, y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una región V de la cadena L humanizada y una región C de la cadena L humana bajo el control de un elemento de control de la expresión.

Entonces, se puede cotransformar una célula hospedadora tal como una célula de mamífero (por ejemplo, célula COS) con estos vectores de expresión y la célula transformada resultante se puede cultivar *in vitro* o *in vivo* para producir el anticuerpo quimérico o humanizado (véase, por ejemplo, el documento WO91/16928). Alternativamente, se pueden unir un ADN que codifica las regiones V y C de la cadena H y un ADN que codifica las regiones V y C de la cadena L a un único vector y transformar en una célula hospedadora adecuada para producir un anticuerpo. Así, en la expresión de un anticuerpo quimérico, un ADN que codifica una secuencia conductora de ratón presente en el ADNc clonado, una región V de la cadena H de ratón y una región C de la cadena H humana, así como un ADN que codifica una secuencia conductora de ratón, una región V de la cadena L de ratón y una región C de la cadena L humana, se pueden introducir en un único vector de expresión, tal como el desvelado en, por ejemplo, el documento WO94/11523. En la expresión de un anticuerpo humanizado, un ADN que codifica una región V de la cadena H humanizada y una región C de la cadena H humana y un ADN que codifica una región V de la cadena L humanizada y una región C de la cadena L humana se pueden introducir en un único vector de expresión, tal como el desvelado

en, por ejemplo, el documento WO94/11523. Dicho vector se usa para transformar una célula hospedadora y el hospedador transformado se cultiva *in vivo* o *in vitro* para producir un anticuerpo quimérico o humanizado de interés.

Se puede usar cualquier sistema de expresión para producir los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención. Por ejemplo, células eucariotas incluyen células de animales tales como líneas celulares establecidas de mamífero, células fúngicas y células de levadura; células procariotas incluyen células bacterianas tales como *Escherichia coli*. Preferentemente, el anticuerpo quimérico o humanizado de la presente invención se expresa en una célula de mamífero tal como una célula COS o CHO. Se puede usar cualquier promotor convencional útil para la expresión en células de mamífero. Por ejemplo, se usa preferentemente el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (HCMV). Además, los promotores para la expresión génica en células de mamífero pueden incluir promotores de virus, tales como los de retrovirus, virus del polio, adenovirus y virus simio (SV) 40, y promotores derivados de células de mamífero, tales como los del factor 1 alfa de elongación humano de la cadena de polipéptidos humana (HEF-1 alfa). Por ejemplo, se puede usar fácilmente el promotor de SV40 según Mulligan et al. Method (Nature, 277, 108-14, 1979); se puede usar fácilmente Mizushima, S. et al. Method (Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990) con el promotor de HEF-1 alfa.

El origen de replicación incluye el derivado de SV40, virus del polio, adenovirus o virus del papiloma bovino (BPV). Además, el vector de expresión puede comprender un gen para fosfotransferasa APH(3') II o I (neo), timidina cinasa (TK), xantina-guanina fosforibosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt) o dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcador selectivo para aumentar el número de copias del gen en un sistema de célula hospedadora. El anticuerpo quimérico o humanizado de interés que se produce cultivando el transformante transformado con un ADN que codifica el anticuerpo quimérico o humanizado se puede aislar de la célula y luego purificar.

El aislamiento y la purificación del anticuerpo quimérico o humanizado de interés se puede llevar a cabo usando una columna de proteína A-agarosa, pero también se puede realizar por cualquier método usado en el aislamiento y la purificación de una proteína y así no está limitado. Por ejemplo, se pueden seleccionar opcionalmente o combinar una cromatografía, ultrafiltración, precipitación por sales y diálisis para aislar y purificar el anticuerpo quimérico o humanizado. Después de aislar el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado, la concentración del anticuerpo purificado resultante se puede determinar por ELISA.

La determinación de la actividad de unión al antígeno u otras actividades que incluyen la actividad de unión a una célula normal del anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado se puede realizar por cualquier método conocido (Antibodies A Laboratory Manual, Ed. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Como método para la determinación de la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo, se pueden emplear técnicas tales como ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), EIA (enzimoinmunoanálisis), RIA (radioinmunoensayo) o ensayo fluorescente. En ELISA, un anticuerpo se inmoviliza sobre una placa, y un antígeno para el anticuerpo se añade a la placa, entonces se añade una muestra que contiene el anticuerpo deseado, tal como el sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o un anticuerpo purificado. A continuación, se añade a la placa un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y se marca con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y ésta se preincuba. Después de lavar, se añade a la placa un sustrato enzimático tal como fosfato de p-nitrofenilo, y se mide la absorbancia para evaluar la capacidad de unión al antígeno de la muestra de interés. La evaluación de la actividad de unión al antígeno también se puede realizar usando BIAcore (Pharmacia).

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

(iii) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras

realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. N° 5.571.894; y patente de EE.UU. N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5 (iv) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. A modo de ejemplo, un brazo de unión al marcador de células contra el cáncer se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIH (CD16), de manera que concentren los mecanismos de defensa celular en la célula cancerosa. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en la célula cancerosa. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al marcador de células cancerosas y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)₂).

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

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

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

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

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Se pueden producir anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Agentes de

reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. N° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

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

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

También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina (Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de la bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

(v) Conjugados de anticuerpo y otras modificaciones

Los anticuerpos de la presente invención se conjugan opcionalmente con un agente citotóxico o terapéutico. Por ejemplo, un agente terapéutico incluye cualquier agente quimioterapéutico que es útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileniofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; elformicina; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK@ razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS

2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Los agentes terapéuticos también incluyen agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, onapristona y toremifeno (Fareston®); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

En el presente documento también se contemplan conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (patente de EE.UU. Nº 5.208.020), un tricoteno y CC 1065. En una realización preferida de la invención, los anticuerpos están conjugados con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me, que se puede reducir a May-SH3 y reaccionar con anticuerpos modificados (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)) para generar un conjugado de maitansinoide-anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo se puede conjugar con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, gamma1I, alfa2I, alfa3I, N-acetil-gamma1I, PSAG y OI1 (Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) y Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

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

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

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidilo (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo·HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo),

aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato), compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo (véase el documento WO94/11026). El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil de ácido, conector sensible de peptidasa, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Charm et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico se puede preparar, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. En otra realización más, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco antineoplásico activo (véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. N° 4.975.278). El componente de enzima de tales conjugados incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

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

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

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

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

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

Se contemplan modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede desear mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de

nucleótidos apropiados en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se hace cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glucosilación.

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

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

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

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

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

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

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

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

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

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

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

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

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se expresan en un modo monovalente en partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto del gen III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se ha desvelado en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la

modificación se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para el posterior desarrollo.

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

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

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

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

Diagnóstico de una enfermedad asociada a CDH3

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar como marcador para diagnosticar una enfermedad que está asociada a CDH3 tal como cáncer. Más específicamente, detectando el polipéptido CDH3 con el anticuerpo de la presente invención en una muestra derivada de sujeto, se puede diagnosticar una enfermedad asociada a CDH3. Así, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico de una enfermedad asociada a CDH3 o una predisposición para desarrollar la enfermedad en un sujeto detectando el polipéptido CDH3 con el anticuerpo de la presente invención en la muestra derivada de sujeto. Los métodos comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con el anticuerpo o su fragmento de la presente invención;

(b) detectar el polipéptido CDH3 en la muestra o espécimen; y

(c) juzgar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar la enfermedad basándose en la abundancia relativa de la proteína CDH3 en comparación con un control.

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

Alternativamente, en otras realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se puede usar para detectar u obtener imágenes un cáncer en un cuerpo vivo. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos de detección u obtención de imágenes de un cáncer que comprenden las etapas de:

(1) administrar a un sujeto el anticuerpo o su fragmento de la presente invención;

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

(3) determinar la localización del anticuerpo o el fragmento, dentro del sujeto.

Alternativamente, según la presente invención, se pueden detectar células o tejidos cancerosos en un sujeto. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos de detección de un cáncer, en el que se expresa CDH3, en un sujeto, que comprenden: administrar el anticuerpo o su fragmento de la presente invención al sujeto permitiendo que el anticuerpo o fragmento se una específicamente al polipéptido CDH3 en células o tejido del sujeto; visualizar el anticuerpo unido en las células o tejido; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células o tejido con un células

o tejido de control normal, en el que un aumento en el nivel del anticuerpo unido a las células o tejido del sujeto con respecto a las células o tejido de control normal es indicativo de un cáncer en el sujeto.

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

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

Se han empleado métodos similares para otros anticuerpos, y el médico habitual conocerá diversos métodos adecuados para obtener imágenes de la localización del anticuerpo detectablemente unido o fragmentos dentro del cuerpo. Como una guía no limitante, se administran aproximadamente 10-1000 microgramos (mcg), preferentemente aproximadamente 50-500 mcg, más preferentemente aproximadamente 100-300 mcg, más preferentemente aproximadamente 200-300 mcg de anticuerpo purificado. Por ejemplo, dosis aplicables para seres humanos incluyen aproximadamente 100-200 mcg/kg de peso corporal, o 350-700 mg/m² de área superficial del cuerpo.

Kits para diagnosticar una enfermedad asociada a CDH3

La presente invención proporciona un kit para el diagnóstico de una enfermedad asociada a CDH3. Específicamente, el kit incluye el anticuerpo o su fragmento de la presente invención como reactivo de detección para el polipéptido CDH3. En una realización, el anticuerpo para el kit de la presente invención se puede marcar con sustancia fluorescente, sustancia luminiscente o radioisótopo. Se conocen bien en la técnica los métodos para marcar los anticuerpos y detectar los anticuerpos marcados y se puede emplear cualquier marca y método para la presente invención.

Además, el kit puede incluir reactivos de control positivo y negativo, y un anticuerpo secundario para detectar el anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, muestras de tejido obtenidas de sujetos normales sanos o tejidos no cancerosos pueden servir de reactivos de control útiles. El kit de la presente invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos (por ejemplo, escritos, cinta, CD-ROM, etc.) con instrucciones para su uso. Estos reactivos y tales pueden ser retenidos en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En otras realizaciones, la invención proporciona además un kit para su uso en detectar, obtener imágenes o tratar un cáncer dentro de un sujeto que se va a diagnosticar que comprende el anticuerpo de la presente invención. Alternativamente, la presente invención también proporciona un agente de diagnóstico que comprende el anticuerpo de la presente invención, de manera que el agente se usa para administración en un sujeto que se va a diagnosticar para una enfermedad asociada a CDH3, que incluye un cáncer. En realizaciones preferibles, el anticuerpo de la presente invención se puede marcar con un radioisótopo. Por ejemplo, el kit de la presente invención puede contener el anticuerpo de la presente invención modificado con agente quelante y sustancia radiactiva. MX-DOPA es un agente quelante preferible para modificar el anticuerpo. Mientras tanto, se puede usar indio-111 (¹¹¹In) como trazador para la obtención de imágenes biológicas. Alternativamente, con el fin de radioinmunoterapia para una enfermedad asociada a CDH3, el anticuerpo se puede marcar con beta-núclidos, por ejemplo, itrio-90 (⁹⁰Y). En la presente invención, también se pueden proporcionar indio-111 (¹¹¹In) o itrio-90 (⁹⁰Y) como sal o su disolución. Una sal adecuada de indio-111 (¹¹¹In) o itrio-90 (⁹⁰Y) es el cloruro. En una realización preferible, una enfermedad asociada a CDH3 es cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, de mama, gástrico o de hígado.

Usos terapéuticos

A continuación se describen métodos y composiciones farmacéuticas para tratar y/o prevenir una enfermedad asociada a CDH3, o inhibir el crecimiento celular que expresa CDH3 usando el anticuerpo de la presente invención conjugado con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo. En una realización típica, una enfermedad asociada a CDH3 es cáncer, que incluye, pero no se limita a, una célula de cáncer pancreático, de pulmón, colon, próstata, mama, gástrico o de hígado. Específicamente, el método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada a CDH3, o inhibición del crecimiento celular que expresa CDH3, en un sujeto según la presente invención comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o su fragmento de la presente invención conjugado con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo.

El sujeto en la presente invención puede ser animales que incluyen mamíferos y animales aviares. Por ejemplo, los mamíferos pueden incluir seres humanos, ratones, ratas, monos, conejos y perros.

El anticuerpo o su fragmento descrito en el presente documento se puede unir específicamente al polipéptido CDH3, de manera que cuando el anticuerpo o su fragmento se administran a un sujeto, se une al polipéptido CDH3 en el

sujeto y puede suprimir el crecimiento celular que expresa CDH3, tal como células cancerosas. Alternativamente, si el anticuerpo o su fragmento se puede conjugar con un resto terapéutico y administrar a un sujeto, se administra a una región que expresa el polipéptido CDH3 (es decir, región sufriendo) en un sujeto y el resto terapéutico se puede administrar selectivamente a la región sufriendo y actuar sobre ella. Tal resto terapéutico puede ser cualquier terapéutico que sea conocido o se desarrolle por tener una eficacia terapéutica sobre el cáncer e incluye, pero no se limita a, una marca de radioisótopo y agente quimioterapéutico. Se puede seleccionar una marca de radioisótopo que se puede usar como terapéutico dependiendo de una variedad de elementos que incluyen energía de rayos beta y su eficiencia de emisión, la presencia o ausencia de rayo gamma emitido, su energía y eficiencia de emisión, semivida física y procedimiento de marcado. Generalmente, se puede usar la marca de radioisótopo basado en itrio (tal como ^{90}Y) y yodo (tal como ^{125}I y ^{131}I). Un agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente que sea conocido o se desarrollará para tratar el cáncer e incluye, pero no se limita a, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, cisplatino, carboplatino, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel. El anticuerpo o su fragmento de la presente invención se puede unir selectivamente al polipéptido CDH3 y no se une a una célula normal, de manera que el efecto secundario que se produce por el anticuerpo o su fragmento, o radioisótopo o agente quimioterapéutico, se puede evitar eficazmente y, por tanto, la potencia terapéutica puede ser alta.

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

Se debe entender además que una mezcla de diferentes anticuerpos monoclonales, tal como una mezcla de los anticuerpos monoclonales específicos descritos en el presente documento o fragmentos, se puede administrar, si fuera necesario o se deseara, para aliviar enfermedades asociadas a CDH3. De hecho, el usar una mezcla de anticuerpos monoclonales, o sus fragmentos, en una mezcla para elegir como diana varios antígenos, o diferentes epítopes, sobre células de enfermedad, es un enfoque ventajoso, particularmente para prevenir la evasión de células tumorales y/o células cancerosas debido a la regulación por disminución de uno de los antígenos.

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Así, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir una enfermedad asociada a CDH3, o inhibir crecimiento celular que expresa CDH3, que comprenden una cantidad eficaz del anticuerpo o su fragmento de la presente invención conjugado con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo, y vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

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

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

Aunque dependiendo de las condiciones y edad del sujeto y/o vía de administración, un experto en la materia puede seleccionar una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en una cantidad tal que el anticuerpo según la

presente invención se administre al sujeto en un día en una cantidad de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 mcg por kg de peso corporal de sujeto, y preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mcg por kg de peso corporal de sujeto. Se pueden seleccionar el intervalo de administración y los tiempos en vista de la condición y edad del sujeto, vía de administración y respuesta a la composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar al sujeto de una a 5 veces, preferentemente 1 vez al día durante 5 a 10 días.

En otro aspecto, si la composición que comprende el anticuerpo marcado con radioisótopo se administra por vía parenteral, la dosis administrada para un único adulto es 0,1 mCi/kg a 1,0 mCi/kg, preferentemente 0,1 mCi/kg a 0,5 mCi/kg, y más preferentemente 0,4 mCi/kg de una vez. La composición farmacéutica se puede administrar por vía sistémica o local. Se administra preferentemente en un modo de administración dirigida de manera que se administre el componente activo a un sitio afectado.

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

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

En otra realización, se administra quimioterapia o radioterapia, preferentemente al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, y más preferentemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses) tras usar los métodos y composiciones que contienen el anticuerpo de la presente invención. Se puede administrar quimioterapia o radioterapia administrada antes de, simultáneamente con, o tras el tratamiento usando los métodos y las composiciones según la presente invención por cualquier método conocido en la técnica.

En otra realización, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo de la presente invención conjugado con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad asociada a CDH3. En particular, la presente invención proporciona además un uso de anticuerpo radiomarcado de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer.

Alternativamente, la presente invención proporciona además el anticuerpo de la presente invención conjugado con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo para su uso en el tratamiento de o prevención de una enfermedad asociada a CDH3. En particular, también se proporciona el anticuerpo radiomarcado de la presente invención para su uso en radioinmunoterapia para el cáncer. Alternativamente, la presente invención proporciona además un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada a CDH3, en el que el método o proceso comprende la etapa de formular un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con el anticuerpo de la presente invención como principios activos. En particular, la presente invención proporciona además un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de un cáncer, en el que el método o proceso comprende la etapa de formular un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con el anticuerpo radiomarcado de la presente invención como principios activos.

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

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

[EJEMPLOS]

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

Materiales y métodosProducción de anticuerpos

Se amplificó el dominio extracelular codificado por el gen CDH3 (SEQ ID NO: 83) a partir del conjunto de ADNc derivado de células cancerosas. El producto se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen, CA). Para producir anticuerpo específico para CDH3, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con el vector de expresión de dominio (17,5 microg/inyección) cada dos semanas durante un mes. Después de la confirmación del título de anticuerpos, se extrajeron esplenocitos de los ratones y se fusionaron con células de mieloma para preparar hibridomas. Se cribaron los hibridomas que pueden producir un anticuerpo que se une al antígeno CDH3 nativo sobre la superficie de las células cancerosas. Mediante el cribado, se confirmaron el clon #3, clon #4, clon #5 y clon #6 de hibridoma para producir anticuerpo específico de antígeno a alto nivel, por tanto estos hibridomas se seleccionaron para producir anticuerpo para experimentos adicionales. Se inyectaron el clon #3, clon #4, clon #5 y clon #6 de hibridoma por vía intraperitoneal en ratones, y se recuperó la ascitis después de 2 a 3 semanas. Los anticuerpos se purificaron de la ascitis usando columna de proteína A (GE Healthcare, NJ). En el presente documento, los anticuerpos también se denominan clon #3, clon #4, clon #4 y clon #6.

Cultivo celular

Se usó H1373, la línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano, para el estudio terapéutico *in vivo* puesto que se confirmó que expresaba el polipéptido CDH3. Se compró H1373 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA), y se mantuvo en RPMI complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y 1 % de penicilina/estreptomicina a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂.

Radiomarcado

Se marcaron con itrio-90 (90Y) los anticuerpos anti-CDH3 monoclonales de ratón producidos por el clon #3, clon #4, clon #5, clon #6 de hibridoma y el anticuerpo de control, que era IgG1 de ratón normal (Nordic immunological laboratories, Tiburg, Países Bajos). El anticuerpo se marcó con 90Y mediante un agente quelante de ión metálico bifuncional, p-SCN-Bn-DTPA (Macrocyclics, Dallas, TX, EE.UU.). Se conjugó un miligramo del anticuerpo con el quelante en dimetilformamida a una relación molar de 1:5, respectivamente. Después de la incubación a 37 °C durante 20 horas, se purificaron los complejos anticuerpo-quelante usando Columna 6 de Biospin (Bio-Rad, Tokio, Japón). Se pre-incubó 90YCl₃ (QSA Global, Braunschweig, Alemania) con ácido acético 0,25 M (pH 5,5) durante 5 minutos a temperatura ambiente en paralelo. Para obtener anticuerpos marcados con 90Y, el complejo de anticuerpo-quelante se incubó con la disolución preincubada de 90YCl₃ a 37 °C durante 1 hora, respectivamente. El anticuerpo marcado se purificó usando la Columna 6 de Biospin según las instrucciones del fabricante. Durante los procesos de marcado, no se observó degradación de estos anticuerpos.

Modelos de xenoinjerto

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

Radioterapia

Se asignaron aleatoriamente ratones de xenoinjerto a diez grupos de tratamiento diferentes. Se prepararon los anticuerpos marcados con 90Y (4-10 mCi/mg) como se ha descrito anteriormente. Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con el clon #3, clon #4, clon #5 o clon #6 marcado con 90Y o no marcado. Se inyectó IgG1 de ratón normal marcada con 90Y como control. Se ajustó la radiactividad de los anticuerpos inyectados a 100 microCi por animal. Se monitorizaron el peso corporal y el volumen del tumor de los ratones de xenoinjerto tratados durante 5 semanas después de la inyección. El volumen del tumor (mm³) se calculó usando la siguiente fórmula: (el diámetro más corto)² x (el diámetro más largo) x 0,5.

SDS-PAGE reducida

Se mezclaron cada 5 micro-g de anticuerpo anti-CDH3 con tampón SDS que incluía 4 % de SDS, Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), 20 % de glicerol, 0,04 % de azul de bromofenol y 10 % de mercaptoetanol. Después de calentarse, las mezclas se aplicaron a 4-20 % de gel de SDS-PAGE en gradiente. Entonces, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (CBB) y se destiñó usando 10 % de metanol y 7 % de ácido acético. Se capturó una imagen del gel por escáner.

Análisis de secuencias de aminoácidos de la región variable

Se extrajeron ARN totales del clon #3, clon #4 y clon #5 de hibridoma usando RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Los ADNc se sintetizaron a partir de los ARN totales usando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen). Se amplificaron los polinucleótidos que codificaban las regiones variables de los anticuerpos monoclonales usando la ADN polimerasa NovaTaq (Novagen) y el conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen). Los cebadores para la amplificación son los siguientes:

MulgVH5'-B; 5'-GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCTT-3' (SEQ ID NO: 84) para el cebador de 5' de la cadena pesada,

Mulg kappa VL5'-D (mezcla de los siguientes cebadores); 5'-ACTAGTCGACATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT-3' (SEQ ID NO: 85) y 5'-ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG-3' (SEQ ID NO: 86) para el cebador de 5' de la cadena ligera,

MulgGVH3'-2; 5'-CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG-3' (SEQ ID NO: 87) para el cebador de 5' de la cadena pesada, y

Mulg kappa VL3'-1; 5'-CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3' (SEQ ID NO: 88) para el cebador de 3' de la cadena ligera.

Los productos de PCR se clonaron en pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Se secuenciaron las regiones de inserción y se determinaron las secuencias de ácidos nucleicos de las regiones variables (excepto la secuencia señal) del clon #3, clon #4 y clon #5.

Se usan los siguientes símbolos para los diferentes nucleótidos en las secuencias de cebador;

B como C, G o T, D como A, G o T, H como A, C o T, I como inosina, K como G o T, M como A o C, R como A o G, S como C o G, V como A, C o G, W como A o T y Y como C o T.

Resultados

Para evaluar la eficacia de la radioinmunoterapia dirigida a CDH3, se radiomarcaron anticuerpos anti-CDH3 con el isótopo ⁹⁰Y emisor de beta (t_{1/2}=64,1 horas) y se administraron por inyección intravenosa a ratones sin pelo portadores de tumor. La tasa de crecimiento de los tumores tratados con el clon #3, #4 y #6 marcado con itrio-90 se redujo drásticamente por radiación del itrio-90 conjugado con los anticuerpos (Figura 1). En particular, el clon #3 y clon #6 marcados con ⁹⁰Y suprimieron fuertemente el crecimiento tumoral en ratones de xenoinjerto H1373 durante la observación. Por otra parte, el anticuerpo de control marcado con ⁹⁰Y no mostró efecto sobre el crecimiento tumoral. Por tanto, los efectos terapéuticos de los anticuerpos marcados con ⁹⁰Y parecen depender de sus afinidades por el polipéptido CDH3, que se expresó sobre la superficie de células tumorales. No disminuyeron significativamente los pesos corporales de ratones tratados con cualquier anticuerpos (datos no mostrados).

El clon #3, clon #4 y clon #6 del anticuerpo anti-CDH3 conjugado con itrio-90 ejerció efectos terapéuticos sorprendentes contra el tumor. Por tanto, CDH3 sería una diana atractiva para la terapia del cáncer y el anticuerpo anti-CDH3 estaría disponible como una novedosa herramienta para la terapia del cáncer.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y las regiones Variables de la cadena L de anticuerpos monoclonales de ratón se determinaron del siguiente modo:

clon #3, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):

QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSFWIHVVKQRPMQGLEWIGNIDP
SDSETHYNQYFKDRATLTVDRSSSTAYMHLTSLTSEDSAVYYCARGGTGFSSW
QGGLTVTVSA (SEQ ID NO: 4) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 3);

clon #3, región variable de la cadena L (excepto la secuencia señal):

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIDSYLSWVQKPKGKSPKTLIHRANRL
VDGVPSPRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 12) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 11)

clon #4, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):

LVQLQQPGAELVRPGSSV̇KL̇SCKṪSGYṪFTSẎWMḢWIKQRPIQGLEWIGNIDPS
DSETHYNQNFNDRȦTFTVDKSṠTAẎMELSṠLTSEDṠAVYYCARGGTGFAYW
GQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 20) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 19);

clon #4, región variable de la cadena L (excepto por secuencia señal):

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLGWFQQKPGKSPKTLII
EGVPSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDVGTYYCLQYDEFPRMFGGGTKI
(SEQ ID NO: 28) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 27);

clon #5, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):

LVQLQQPGAELVRPGSSV̇KL̇SCKAṠGYṪFTSẎWMḢWIKQRPIQGLEWIGNIDPS
DSETHYNQKFNDRȦRLTV̇DKSṠTAẎMHLSṠLTSEDṠAVYYCARGGTGFAYW
GQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 36) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 35);

y

clon #5, región variable de la cadena L (excepto la secuencia señal):

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLGWFQQKPGKSPKTLIIHRTDRLI
EGVPSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDVGTYYCLQYDEFPRMFGGGTKLDIK
(SEQ ID NO: 44) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 43).

Las secuencias de CDR de los anticuerpos determinados por la definición de Kabat son las siguientes:

- 10 clon #3, SFWIH (SEQ ID NO: 6) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 5) como
VH CDR1, NIDPSDSETHYNQYFKD (SEQ ID NO: 8) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 7) como VH CDR2 y GGTGFSS (SEQ ID NO: 10) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 9) como VH CDR3, KASQDIDSYLS (SEQ ID NO: 14) (codificado por la secuencia de
ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 13) como VL CDR1, RANRLVD (SEQ ID NO: 16) (codificado por la
15 secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 15) como VL CDR2 y LQYDEFPRM (SEQ ID NO: 18)
(codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 17) como VL CDR3;

- clon #4, SYWMH (SEQ ID NO: 22) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 21)
como VH CDR1, NIDPSDSETHYNQNFND (SEQ ID NO: 24) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 23) como VH CDR2 y GGTGFAY (SEQ ID NO: 26) (codificado por la secuencia de ácidos
20 nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 25) como VH CDR3, KASQDINNYLG (SEQ ID NO: 30) (codificado por la
secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 29) como VL CDR1, RTDRLIE (SEQ ID NO: 32) (codificado
por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 31) como VL CDR2 y LQYDEFPRM (SEQ ID NO: 34)
(codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 33) como VL CDR3; y

- clon #5, SYWMH (SEQ ID NO: 38) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 37)
25 como VH CDR1, NIDPSDSETHYNQKFNDRA (SEQ ID NO: 40) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 39) como VH CDR2 y GGTGFAY (SEQ ID NO: 42) (codificado por la secuencia de ácidos
nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 41) como VH CDR3, KASQDINNYLG (SEQ ID NO: 46) (codificado por la
secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 45) como VL CDR1, RTDRLIE (SEQ ID NO: 48) (codificado
por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 47) como VL CDR2 y LQYDEFPRM (SEQ ID NO: 50)
30 (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 49) como VL CDR3.

- Se realizó análisis de SDS-PAGE en condición reductora. Los patrones de bandas en el gel se caracterizaron por el
intervalo de peso molecular 40-50 kDa que corresponde a la cadena pesada de IgG e intervalos de peso molecular
más bajos de 20-30 kDa que corresponden a la cadena ligera de IgG. El clon #3, clon #4 y clon #5 del anticuerpo
anti-CDH3 presentaron una única banda de cadena pesada y una única banda de cadena ligera como IgG general.
35 Por otra parte, el clon #6 del anticuerpo anti-CDH3 mostró dos bandas de cadena pesada y una única banda de
cadena ligera. La glucosilación incompleta en la región variable de la cadena pesada fue la causa de la banda de
cadena pesada adicional durante la SDS-PAGE reducida. Como se muestra en la Figura 2, la glucosilación
incompleta afecta la uniformidad del anticuerpo, y puede crear dificultad en el desarrollo de fármacos terapéuticos.
Por tanto, se diseñaron las variantes del clon #6 que tienen una sustitución de un único aminoácido en el sitio de
40 glucosilación del clon #6 para evitar la glucosilación en la región variable de la cadena H. Estas variantes serían más
aplicables para el desarrollo de fármacos contra el cáncer basados en anticuerpos que el clon #6.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena H de las variantes del clon #6 son las siguientes (el subrayado indica un resto de aminoácido sustituido):

5 clon #6NS, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):
QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKSSGYTFTSYWIHWVKQRPGHGLEWIGEIDPSDSYTYYNQNFKGKATLTIDK
SSSTAYMQLNSLTSEDSAVFYCARSGYGNLFVYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 68) (codificado por la
secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 67);

10 clon #6NT, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):
QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKSSGYTFTSYWIHWVKQRPGHGLEWIGEIDPSDTYTYYNQNFKGKATLTIDK
SSSTAYMQLNSLTSEDSAVFYCARSGYGNLFVYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 72) (codificado por la
secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 71);

clon #6NA, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):
QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKSSGYTFTSYWIHWVKQRPGHGLEWIGEIDPSDIATTYYNQNFKGKATLTIDK
SSSTAYMQLNSLTSEDSAVFYCARSGYGNLFVYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 76) (codificado por la
secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 75); y

15 clon #6NQ, región variable de la cadena H (excepto la secuencia señal):
QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKSSGYTFTSYWIHWVKQRPGHGLEWIGEIDPSDQYTYYNQNFKGKATLTID
KSSSTAYMQLNSLTSEDSAVFYCARSGYGNLFVYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 80) (codificado por la
secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 79).

20 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena L (excepto la secuencia señal) de las
variantes del clon #6 son las mismas que las del clon #6;

QIVLTQSPAIMSSSPGEKVTMCSATSSVTYMYWYQQKPGSSPKPWIFRTSNLA
SGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSEMEAEADAATYYCQHYHIYPRTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 60) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 59).

25 Las secuencias de VH CDR2 determinadas por la definición de Kabat de las variantes del clon #6 son:
EIDPSDSYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 70) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 69) para el clon #6NS, EIDPSDTYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 74) (codificado por la secuencia de
ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 73) para el clon #6NT, EIDPSDAYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 78)
(codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 77) para el clon #6NA y
EIDPSDQYTYYNQNFKG (SEQ ID NO: 82) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 81) para el clon #6NQ.

30 Las otras secuencias de CDR determinadas por la definición de Kabat de las variantes son las mismas que las del
clon #6; SYWIH (SEQ ID NO: 54) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 53)
como VH CDR1, SGYGNLFVY (SEQ ID NO: 58) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en
SEQ ID NO: 57) como VH CDR3, SATSSVTYMY (SEQ ID NO: 62) (codificado por la secuencia de ácidos nucleicos
mostrada en SEQ ID NO: 61) como VL CDR1, RTSNLAS (SEQ ID NO: 64) (codificado por la secuencia de ácidos
nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 63) como VL CDR2 y QHYHIYPRT (SEQ ID NO: 66) (codificado por la
35 secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 65) como VL CDR3.

[Aplicabilidad industrial]

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

UNIVERSIDAD DE TOKIO

45 NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY

<120> ANTICUERPOS ANTI-CDH3 Y SUS USOS

ES 2 701 626 T3

<130> ONC-A0926P

<160> 88

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4276

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

tgcgtttttaa aaattgtctt tatttacatt ttacagaaag ttgagaaagt gttattttata	60
tgggggtag ggggtgctgga gattatgaga ctaataacaa ccctcttagc tcgcaccctt	120
tggcaccact acagcttcca aactctggga ctttctcgac tagcttccct ttgttttagct	180
gtgaaatgga agaagcggtc cgggtgtggc ggctcatgcc tgtaacctga gcactctggg	240
aggcggagga tcgcttgagt ccagaagttc aagaccagct tgggcaacat agggtgaccc	300
tccaccctcc ccccgcccca ccacatcgct acaaaaaatt tttaaaaatt agccgggtgt	360
ggtggcgcaa gcctgtagtc tcagcgggag ctgagggagg agaatcgctt cagcccgga	420
ggtcgaggct gtagtgagcc gagatcggc tactgcactc ctgggcgaca gagcgagacc	480
ctgtctccaa aaaaaaaaaa aaaagaaaaa agaggaagtt gtatccaatt cagaaacgcg	540
gtccttcggg acctgctagt ttatacccc ggaggatcct ccccgcggg ctggcacggg	600
aggtggagaa agaggcttgg gcgggccgcg tgtagccgcg tgtgggagga cgcacgggcc	660
tgcttcaaag ctttgggata acagcgctc cgggggataa tgaatgcgga gcctccgttt	720
tcagtcgact tcagatgtgt ctccactttt ttccgctgta gccgcaaggc aaggaaacat	780
ttctcttccc gtactgagga ggctgaggag tgcactgggt gttcttttct cctctaacc	840
agaactgcga gacagaggct ggtccctgt aaagaacagc tcagaaaaag ccaggagagc	900
gcaggagggc atccgggagg ccaggagggg ttcgctgggg cctcaaccgc acccacatcg	960
gtcccacctg cgagggggcg ggacctcgtg gcgctggacc aatcagcacc cacctgcgct	1020
cacctggcct cctcccgtg gctcccgggg gctgcggtgc tcaaaggggc aagagctgag	1080
cggaacaccg gcccgccgtc gcggcagctg ctccaccct ctctctgcag ccatggggct	1140
ccctcgtgga cctctcgcgt ctctcctct tctccaggtt tgctggctgc agtgcgggc	1200
ctccgagccg tgccgggcgg tcttcagga ggctgaagt accttgagg cgggagggcg	1260
ggagcaggag cccggccagg cgctggggaa agtattcatg ggctgccctg ggcaagagcc	1320

ES 2 701 626 T3

agctctgttt agcactgata atgatgactt cactgtgcgg aatggcgaga cagtccagga	1380
aagaaggtca ctgaaggaaa ggaatccatt gaagatcttc ccatccaaac gtatcttacg	1440
aagacacaag agagattggg tggttgctcc aatatctgtc cctgaaaatg gcaagggctc	1500
cttccccag agactgaatc agctcaagtc taataaagat agagacacca agattttcta	1560
cagcatcacg gggccggggg cagacagccc ccctgagggt gtcttcgctg tagagaagga	1620
gacaggctgg ttgtttgtga ataagccact ggaccgggag gagattgcca agtatgagct	1680
ctttggccac gctgtgtcag agaatgggtc ctcagtggag gaccccatga acatctccat	1740
catcgtgacc gaccagaatg accacaagcc caagtttacc caggacacct tccgaggggag	1800
tgtcttagag ggagtcctac caggtaacttc tgtgatgcag gtgacagcca cggtatgagga	1860
tgatgccatc tacacctaca atgggggtgt tgcttactcc atccatagcc aagaaccaa	1920
ggaccacac gacctcatgt tcaccattca ccggagcaca ggcaccatca gcgtcatctc	1980
cagtggcctg gaccgggaaa aagtcctga gtacacactg accatccagg ccacagacat	2040
ggatggggac ggctccacca ccacggcagt ggcagtagtg gagatccttg atgccaatga	2100
caatgctccc atgtttgacc ccagaagta cgaggcccat gtgcctgaga atgcagtggg	2160
ccatgagggtg cagaggctga cggctactga tctggacgcc cccaactcac cagcgtggcg	2220
tgccacctac cttatcatgg gcggtgacga cggggaccat tttaccatca ccaccaccc	2280
tgagagcaac cagggcaccc tgacaaccag gaagggtttg gatattgagg ccaaaaacca	2340
gcacaccctg tacgttgaag tgaccaacga ggcccctttt gtgctgaagc tcccaacctc	2400
cacagccacc atagtgggtc acgtggagga tgtgaatgag gcacctgtgt ttgtcccacc	2460
ctccaaagtc gttgagggtc aggagggcat cccactggg gagcctgtgt gtgtctacac	2520
tgcagaagac cctgacaagg agaataaaaa gatcagctac cgcacctga gagaccagc	2580
agggtggcta gccatggacc cagacagtgg gcaggtcaca gctgtgggca ccctcgaccg	2640
tgaggatgag cagtttgtga ggaacaacat ctatgaagtc atggctcttg ccatggacaa	2700
tggaagccct cccaccactg gcacgggaac cttctgcta acactgattg atgtcaatga	2760
ccatggccca gtccctgagc ccgctcagat caccatctgc aaccaaagcc ctgtgcgcca	2820
ggtgctgaac atcacggaca aggacctgtc tccccacacc tcccctttcc aggcccagct	2880
cacagatgac tcagacatct actggacggc agaggtaaac gaggaagggtg acacagtgg	2940
cttgtccctg aagaagttcc tgaagcagga tacatatgac gtgcaccttt ctctgtctga	3000
ccatggcaac aaagagcagc tgacggtgat cagggccact gtgtgcgact gccatggcca	3060
tgtcgaaacc tgccctggac cctggaaggg aggtttcatc ctccctgtgc tgggggctgt	3120
cctggctctg ctgttcctcc tgctggtgct gcttttgttg gtgagaaaga agcggaagat	3180

ES 2 701 626 T3

```

caaggagccc ctctactcc cagaagatga caccogtgac aacgtcttct actatggcga      3240
agaggggggt ggogaagagg accaggacta tgacatcacc cagctccacc gaggtctgga      3300
ggccaggccg gaggtggttc tccgcaatga cgtggcacca accatcatcc cgacaacctat      3360
gtaccgtcct cggccagcca acccagatga aatcggcaac tttataattg agaacctgaa      3420
ggcggctaac acagacccca cagccccgcc ctacgacacc ctcttgggtg tcgactatga      3480
gggcagcggc tccgacgccg cgtccctgag ctccctcacc tctccgcct ccgaccaaga      3540
ccaagattac gattatctga acgagtgggg cagccgcttc aagaagctgg cagacatgta      3600
cggtggcggg gaggacgact aggcggcctg cctgcagggc tggggaccaa acgtcaggcc      3660
acagagcatc tccaaggggt ctcagttccc ccttcagctg aggacttcgg agcttgtcag      3720
gaagtggccg tagcaacttg gcggagacag gctatgagtc tgacgttaga gtggtggcct      3780
ccttagcctt tcaggatgga ggaatgtggg cagtttgact tcagcactga aaacctctcc      3840
acctgggcca gggttgccct agaggccaag ttccagaag cctcttacct gccgtaaaat      3900
gctcaaccct gtgtcctggg cctgggcctg ctgtgactga cctacagtgg actttctctc      3960
tggaatggaa ccttcttagg cctcctggtg caacttaatt ttttttttta atgctatctt      4020
caaaacgtta gagaaagtgc ttcaaaagtg cagcccagag ctgctgggcc cactggccgt      4080
cctgcatttc tggtttccag accccaatgc ctcccattcg gatggatctc tgcgttttta      4140
tactgagtgt gcctaggttg ccccttattt tttattttcc ctgttgcggt gctatagatg      4200
aagggtgagg acaatcgtgt atatgtacta gaactttttt attaaagaaa cttttccag      4260
aggtgcctgg ggagtg

```

<210> 2

<211> 829

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr

```

10

ES 2 701 626 T3

65						70						75						80
Val	Gln	Glu	Arg	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Arg	Asn	Pro	Leu	Lys	Ile	Phe			
				85					90					95				
Pro	Ser	Lys	Arg	Ile	Leu	Arg	Arg	His	Lys	Arg	Asp	Trp	Val	Val	Ala			
			100					105					110					
Pro	Ile	Ser	Val	Pro	Glu	Asn	Gly	Lys	Gly	Pro	Phe	Pro	Gln	Arg	Leu			
			115				120					125						
Asn	Gln	Leu	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Arg	Asp	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Ser			
			130				135				140							
Ile	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Val	Phe	Ala	Val			
145					150					155					160			
Glu	Lys	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Asn	Lys	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu			
				165					170					175				
Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Glu	Leu	Phe	Gly	His	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gly			
			180					185					190					
Ala	Ser	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Asn	Ile	Ser	Ile	Ile	Val	Thr	Asp	Gln			
			195				200					205						
Asn	Asp	His	Lys	Pro	Lys	Phe	Thr	Gln	Asp	Thr	Phe	Arg	Gly	Ser	Val			
						215					220							
Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Gln	Val	Thr	Ala	Thr			
225					230					235					240			
Asp	Glu	Asp	Asp	Ala	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Tyr	Ser			
				245					250					255				
Ile	His	Ser	Gln	Glu	Pro	Lys	Asp	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile			
			260					265					270					
His	Arg	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg			
			275				280					285						
Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp			
						295					300							
Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Leu	Asp			
305					310					315					320			

ES 2 701 626 T3

Ala	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Met	Phe	Asp	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ala	His	
				325					330					335		
Val	Pro	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	His	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr	
			340					345					350			
Asp	Leu	Asp	Ala	Pro	Asn	Ser	Pro	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ile	
		355					360					365				
Met	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	His	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	His	Pro	Glu	
	370					375					380					
Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	
385					390					395					400	
Lys	Asn	Gln	His	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Pro	Phe	
				405					410					415		
Val	Leu	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Val	His	Val	Glu	
			420					425					430			
Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Val	Glu	
		435					440					445				
Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Val	Cys	Val	Tyr	Thr	Ala	
	450					455					460					
Glu	Asp	Pro	Asp	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	
465					470				475						480	
Asp	Pro	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Met	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Thr	
				485				490					495			
Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Val	Arg	Asn	Asn	
			500					505					510			
Ile	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Leu	Ala	Met	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr	
		515					520					525				
Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asp	His	
	530					535					540					
Gly	Pro	Val	Pro	Glu	Pro	Arg	Gln	Ile	Thr	Ile	Cys	Asn	Gln	Ser	Pro	
545					550					555					560	
Val	Arg	Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	His	Thr	
				565					570					575		

ES 2 701 626 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 348

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 701 626 T3

<400> 3

```

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtgaggc ctgggtcttc agtgaagctg      60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agtttctgga tacattgggt gaagcagagg      120
cctatgcaag gccttgaatg gattggtaac attgaccctt ctgacagtga aactcactac      180
aatcaatatt tcaaggacag ggccacattg actgtagaca ggtcttccag cacagcctac      240
atgcacctca ccagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggtggg      300
acagggtttt cttcctgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca      348

```

5 <210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 4

```

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

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

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

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

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80

Met His Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95

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

Thr Val Ser Ala
      115

```

<210> 5

15 <211> 15

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 701 626 T3

<400> 5
agtttctgga tacat 15

<210> 6
5 <211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
10 Ser Phe Trp Ile His
1 5

<210> 7
<211> 51
<212> ADN
15 <213> Mus musculus

<400> 7
aacattgacc ctctgacag tgaaactcac tacaatcaat attcaagga c 51

20 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <400> 8

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

Asp

<210> 9
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 9

ES 2 701 626 T3

ggtagggacag ggttttcttc c 21

<210> 10

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

10 Gly Gly Thr Gly Phe Ser Ser
1 5

<210> 11

<211> 321

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 11

gacatcaaaa tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtc ggacattgat agctatttaa gctgggtcca gcagaaacct 120

gggaaatctc ctaagaccct gatccatcgt gcaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagtag cctggaatat 240

gaagatatgg gaatctatta ttgtctacag tatgatgagt ttcctcggac gtccggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

20

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<400> 12

ES 2 701 626 T3

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

<210> 13

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 13

aaggcgagtc aggacattga tagctattta agc 33

10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 14

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Ser	Tyr	Leu	Ser
1				5					10	

20 <210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 701 626 T3

<400> 15
 cgtgcaaata gattggtaga t 21

 <210> 16
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 16
 10
 Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
 1 5

 <210> 17
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 17
 ctacagtatg atgagtttcc tcggacg 27
 20
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25
 <400> 18

 Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Thr
 1 5

 30 <210> 19
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 35 <400> 19

ES 2 701 626 T3

```

ctggtccaac tccagcagcc tggggctgaa ctggtgaggg ctgggtcttc agtgaagctg      60
tcctgcaaga cctctggcta caccttcacc agctactgga tgcattggat aaagcagagg      120
cctatacaag gccttgaatg gattggtaac attgaccctt ctgatagtga aactcactac      180
aatcaaaact tcaatgacag ggccacattc accgtagaca aatcctccag cacagcctac      240
atggaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtct attactgtgc aagaggtggg      300
acaggcttcg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca                    348

```

<210> 20

5 <211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

10

```

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

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

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

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

Asn Asp Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
          65          70          75          80

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

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

Thr Val Ser Ala
          115

```

<210> 21

<211> 15

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 21

ES 2 701 626 T3

agctactgga tgcat 15

<210> 22

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

10 Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 23

<211> 51

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 23

aacattgacc ctctgatag tgaaactcac tacaatcaaa acttcaatga c 51

20 <210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 24

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

Asp

<210> 25

30 <211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 25

ES 2 701 626 T3

ggtgggacag gcttcgctta c 21

<210> 26

$\langle 211 \rangle$ 7

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

10 Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 27

$\langle 211 \rangle$ 321

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 27

gacatcaaga tgaccagatc tccctcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact	60
atcacttgca aggcgagtcg ggacattaat aactatttag gctggttcca acagaaacca	120
ggtaaatctc ctaagaccct gatccatoga acagatagat tgatagaagg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggtatc tgggcaggat tattctctca ccatcagcag cctggaatat	240
gaagatgtgg gaacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttctctggat gttcgggtga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

20

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<400> 28

ES 2 701 626 T3

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

<210> 29

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 29

aaggcgagtc aggacattaa taactattta ggc 33

10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 30

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Gly
1				5					10	

20

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 701 626 T3

<400> 31
 cgaacagata gattgataga a 21

 <210> 32
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 32
 10
 Arg Thr Asp Arg Leu Ile Glu
 1 5

 <210> 33
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 33
 ctacagtatg atgagtttcc tcggatg 27
 20
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25
 <400> 34

 Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Met
 1 5

 30 <210> 35
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 35 <400> 35

ES 2 701 626 T3

```

ctggtccaac tccagcagcc tggggctgaa ctggtgaggg ctgggtcttc agtgaagctg      60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcattggat aaagcagagg      120
cctatacaag gccttgaatg gattggaaac attgaccctt ctgatagtga aactcactac      180
aatcaaaaagt tcaatgacag ggccagatta actgtagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggtggg      300
acaggatttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca      348

```

<210> 36

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 15

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 37

ES 2 701 626 T3

agctactgga tgcat 15

<210> 38

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

10 Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 39

<211> 57

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 39

aacattgacc ctctgatag tgaaactcac tacaatcaaa agttcaatga cagggcc 57

20 <210> 40

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 40

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

Asp Arg Ala

<210> 41

30 <211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 41

ES 2 701 626 T3

ggtgggacag gatttgctta c 21

<210> 42

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

10 Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 43

<211> 321

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 43

gacatcaaga tgaccagtc tccctcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aactatttag gctgggtcca acagaaacca 120
ggtaaatctc ctaagaccct gatccatcgt acagatagat tgatagaagg ggtcccatca 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggcaggat tattctctca ccatcagcag cctggaatat 240
gaagatgtgg gaacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttcctcggat gttcgggtgga 300
ggcaccaagc tggacatcaa a 321

20

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<400> 44

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

ES 2 701 626 T3

Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 His Arg Thr Asp Arg Leu Ile Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg
 85 90 95
 Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 45

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 45

aaggcgagtc aggacattaa taactattta ggc 33

10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 46

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Gly
 1 5 10

20 <210> 47

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

25 <400> 47

cgtacagata gattgataga a 21

ES 2 701 626 T3

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

5

<400> 48

Arg Thr Asp Arg Leu Ile Glu
1 5

10

<210> 49

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

15

<400> 49

ctacagtatg atgagtttc tcgcatg 27

<210> 50

<211> 9

20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Met
1 5

25

<210> 51

<211> 354

<212> ADN

30

<213> Mus musculus

<400> 51

ES 2 701 626 T3

```

caggccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtcaagc ctgggacttc agtgaagctg      60
tcctgcaagt cttctggata caccttcact agctattgga tacactgggt gaaacagagg      120
cctggacatg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgataatta tacttactat      180
aatcaaaatt tcaagggcaa ggccacattg actatagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcgggtct tttactgtgc aagatcgggc      300
tatggtaact tgtttggtta ttggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca          354

```

<210> 52

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

```

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
          115

```

<210> 53

<211> 15

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 53

ES 2 701 626 T3

agctattgga tacac 15

<210> 54

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

10 Ser Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 55

<211> 51

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 55

gagattgac cttctgataa ttatacttac tataatcaaa attcaaggg c 51

20 <210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 56

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

Gly

<210> 57

30 <211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 57

ES 2 701 626 T3

tcgggctatg gtaactgtt tgtttat 27

<210> 58

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

10 Ser Gly Tyr Gly Asn Leu Phe Val Tyr
1 5

<210> 59

<211> 318

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 59

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtttcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atgtcctgca gtgccacctc aagtgttact tacatgtact ggtaccagca gaagccagga	120
tcctccccc aaccctggat ttttcgcaca tccaacctgg cttctggagt ccctactcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcactat catatttacc cacggacgtt cggtggaggc	300
accaagctgg aaatcaaa	318

20

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<400> 60

ES 2 701 626 T3

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61

5 <211> 30

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 61

10 agtgccacct caagtgttac ttacatgtac 30

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 62

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

20

<210> 63

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

25

ES 2 701 626 T3

<400> 63
 cgcacatcca acctggcttc t 21

 <210> 64
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 64
 10

 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

 <210> 65
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 65
 cagcactatc atattaccc acggacg 27
 20

 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25

 <400> 66

 Gln His Tyr His Ile Tyr Pro Arg Thr
 1 5

 30 <210> 67
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 35 <400> 67

ES 2 701 626 T3

```

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtcaagc ctgggacttc agtgaagctg      60
tcctgcaagt cttctggata caccttcact agctattgga tacactgggt gaaacagagg      120
cctggacatg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgattccta tacttactat      180
aatcaaaatt tcaagggcaa ggccacattg actatagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct tttactgtgc aagatcgggc      300
tatggtaact tgtttgttta ttggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca          354

```

<210> 68

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

```

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
      115

```

10

<210> 69

<211> 51

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 69

ES 2 701 626 T3

gagattgattc cttctgattc ctatacttac tataatcaaa atttcaaggg c 51

<210> 70

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

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

10 Gly

<210> 71

<211> 354

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 71

caggtccaac	tgcagcagcc	tggggctgaa	ctgggtcaagc	ctgggacttc	agtgaagctg	60
tcctgcaagt	cttctggata	caccttcact	agctattgga	tacactgggt	gaaacagagg	120
cctggacatg	gccttgagtg	gacgggagag	attgatcctt	ctgataccta	tacttactat	180
aatcaaaaatt	tcaagggcaa	ggccacattg	actatagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcaactca	acagcctgac	atctgaggac	tctgcgggtct	tttactgtgc	aagatcgggc	300
tatggtaact	tggttggtta	ttggggccaa	gggactctgg	tcactgtctc	tgca	354

20

<210> 72

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<400> 72

ES 2 701 626 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 73

5 <211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 73

10 gagattgac cttctgatac ctatacttac tataatcaaa atttcaaggg c 51

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 74

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

Gly

20

ES 2 701 626 T3

<210> 75

<211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

5

<400> 75

```

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtcaagc ctgggacttc agtgaagctg      60
tcctgcaagt cttctggata caccttcact agctattgga tacactgggt gaaacagagg      120
cctggacatg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatgccta tacttactat      180
aatcaaaatt tcaagggcaa ggccacattg actatagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct tttactgtgc aagatcgggc      300
tatggtaact tgtttgttta ttggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca          354

```

10

<210> 76

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 76

```

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
      115

```

ES 2 701 626 T3

<210> 77

<211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

5

<400> 77

gagattgatc cttctgatgc ctatacttac tataatcaaa atttcaaggg c 51

<210> 78

10

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

15

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

Gly

<210> 79

<211> 354

20

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 79

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtcaagc ctgggacttc agtgaagctg	60
tcctgcaagt cttctggata caccttcact agctattgga tacactgggt gaaacagagg	120
cctggacatg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatcagta tacttactat	180
aatcaaaatt tcaagggcaa ggccacattg actatagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct tttactgtgc aagatcgggc	300
tatggtaact tgtttgttta ttggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca	354

25

<210> 80

<211> 118

<212> PRT

ES 2 701 626 T3

<213> Mus musculus

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

5

<210> 81

<211> 51

<212> ADN

10

<213> Mus musculus

<400> 81

gagattgac cttctgatca gtatacttac tataatcaaa attcaaggg c 51

15

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 82

ES 2 701 626 T3

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

Gly

<210> 83

<211> 654

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 701 626 T3

Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Glu	Leu	Phe	Gly	His	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gly	
			180				185						190			
Ala	Ser	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Asn	Ile	Ser	Ile	Ile	Val	Thr	Asp	Gln	
			195				200						205			
Asn	Asp	His	Lys	Pro	Lys	Phe	Thr	Gln	Asp	Thr	Phe	Arg	Gly	Ser	Val	
			210				215						220			
Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Gln	Val	Thr	Ala	Thr	
225						230						235			240	
Asp	Glu	Asp	Asp	Ala	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Tyr	Ser	
			245						250						255	
Ile	His	Ser	Gln	Glu	Pro	Lys	Asp	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile	
			260						265						270	
His	Arg	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg	
			275						280						285	
Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp	
			290						295						300	
Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Leu	Asp	
305						310						315			320	
Ala	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Met	Phe	Asp	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ala	His	
			325						330						335	
Val	Pro	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	His	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr	
			340						345						350	
Asp	Leu	Asp	Ala	Pro	Asn	Ser	Pro	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ile	
			355						360						365	
Met	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	His	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	His	Pro	Glu	
370						375						380				
Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	
385						390						395			400	
Lys	Asn	Gln	His	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Pro	Phe	
			405						410						415	
Val	Leu	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Val	His	Val	Glu	

ES 2 701 626 T3

	420		425		430
Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu	435		440		445
Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala	450		455		460
Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg	465		470		475
Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr	485		490		495
Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn	500		505		510
Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr	515		520		525
Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His	530		535		540
Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro	545		550		555
Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr	565		570		575
Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr	580		585		590
Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys	595		600		605
Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His	610		615		620
Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys	625		630		635
His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly	645		650		

<210> 84

<211> 34

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 701 626 T3

<223> Una secuencia de cebadores de 5' artificialmente sintetizada para VH

<400> 84

gggaattcat graatgsasc tgggtywtgc tctt 34

5

<210> 85

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Una secuencia de cebadores de 5' artificialmente sintetizada para VL

<220>

15

<221> característica_misc

<222> (37)..(37)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 85

20

actagtcgac atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwgc tt 42

<210> 86

<211> 41

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebadores de 5' artificialmente sintetizada para VL

30

<400> 86

actagtcgac atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g 41

<210> 87

<211> 35

35

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 701 626 T3

<220>

<223> Una secuencia de cebadores de 3' artificialmente sintetizada para VH

<220>

5 <221> característica_misc

<222> (30)..(30)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 87

10 cccaagcttc cagggrccar kggataracn grtgg 35

<210> 88

<211> 30

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebadores de 3' artificialmente sintetizada para VL

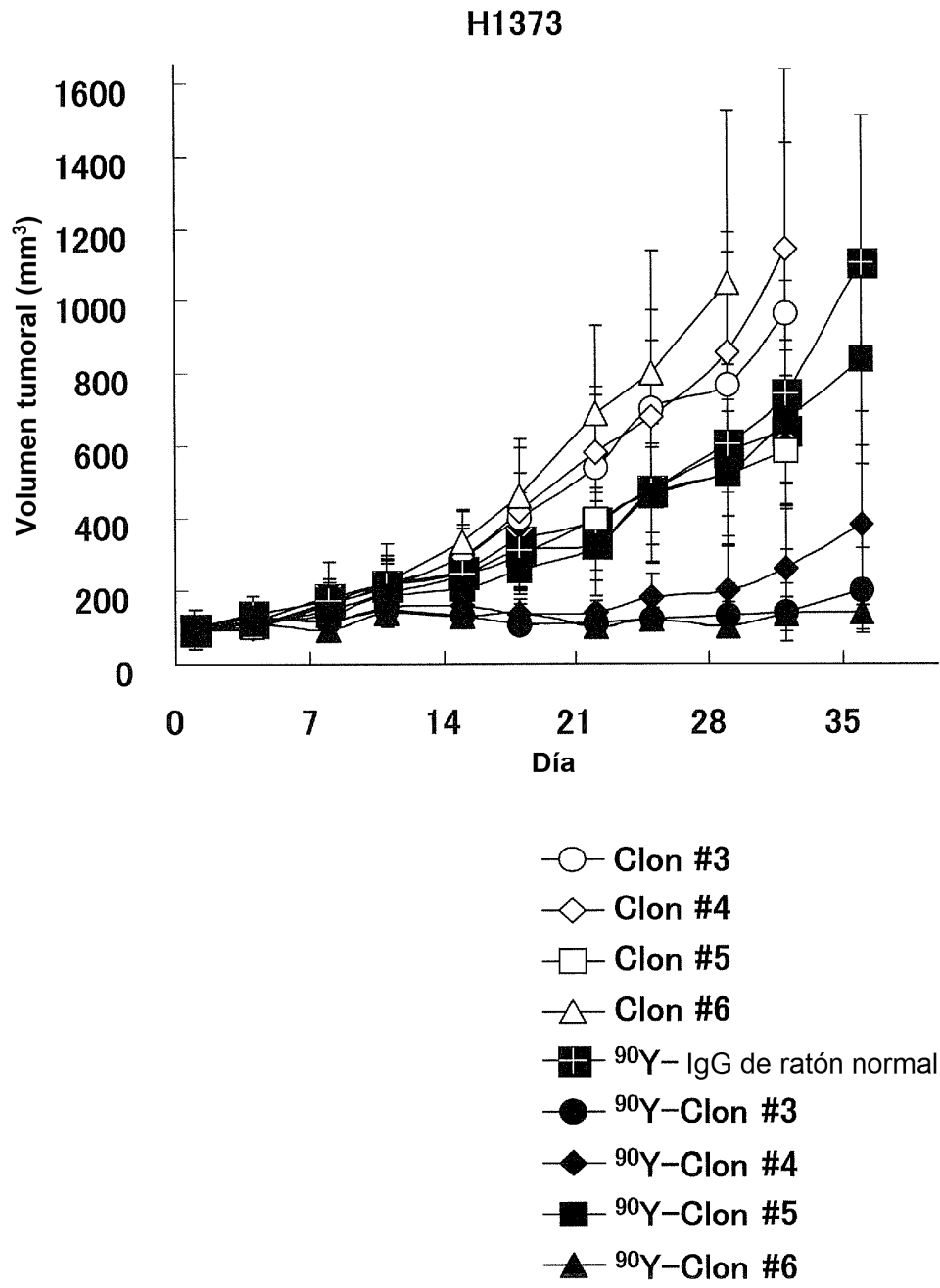
20 <400> 88

cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o su fragmento, en el que el anticuerpo o su fragmento comprende una región V de la cadena H que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una región V de la cadena L que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y en el que el anticuerpo o su fragmento es capaz de unirse a un polipéptido CDH3.
2. El anticuerpo o su fragmento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo y anticuerpo monocatenario.
3. El anticuerpo o su fragmento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
4. El anticuerpo o su fragmento según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. El anticuerpo o su fragmento según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo humanizado comprende además una región estructural (FR) de anticuerpo humano y/o una región constante (C) de anticuerpo humano.
6. El anticuerpo o su fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico, terapéutico o una marca de radioisótopo.
7. El anticuerpo o su fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo se conjuga con una marca fluorescente.
8. El anticuerpo o su fragmento según la reivindicación 6, en el que la marca de radioisótopo se selecciona de 90-⁹⁰itrio (⁹⁰Y) y 111-indio (¹¹¹In).
9. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer.
10. Uso del anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cáncer.
11. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para diagnosticar cáncer o la predisposición a desarrollar cáncer en el que dicho diagnóstico comprende:
 - (a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con dicho anticuerpo;
 - (b) detectar un polipéptido CDH3 en la muestra o espécimen; y
 - (c) juzgar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar cáncer basándose en la abundancia relativa del polipéptido CDH3 en comparación con un control.
12. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer, en el que la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un kit para su uso en el diagnóstico de cáncer, en el que el kit comprende el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

SDS-PAGE reducida

