



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 352 180**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03743010 .5**

(96) Fecha de presentación : **20.02.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1478667**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

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

(30) Prioridad: **26.02.2002 US 359299 P**

(73) Titular/es: **SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.**
Viale Shakespeare, 47
00144 Roma, IT

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2011

(72) Inventor/es: **De Santis, Rita y
Anastasi, Anna Maria**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2011

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-tenascina humana, los procedimientos y materiales para obtenerlos, el uso de dichos anticuerpos para la preparación de medios de diagnóstico y medicamentos para el diagnóstico y el tratamiento,
5 respectivamente, de tumores que expresan tenascina y de los materiales que comprenden dichos anticuerpos adecuados para usar en el campo médico.

Antecedentes de la invención

La especificidad de la terapia de tumores a menudo es una etapa limitante en determinar el éxito de un tratamiento. De hecho, la aparición de efectos tóxicos y la tolerabilidad reducida de
10 ciertos agentes anticancerígenos limitan su uso y la calidad de vida de los pacientes.

La reducción de toxicidad está ligada directamente a la selectividad del tratamiento para las células cancerosas. Los anticuerpos monoclonales representan los medios ideales para el marcaje como objetivo de los tumores de forma específica y, cuando se combinan con el sistema de amplificación de avidita/biotina, constituyen una manera extremadamente potente y
15 selectiva para suministrar restos activos en el sitio tumoral.

Tenascina es una de las proteínas de la matriz extracelular y muestra la expresión restringida de sitio durante embriogénesis y se puede encontrar en tejidos adultos durante la curación de heridas y la tumorogénesis, así como en vasos sanguíneos tumorales formados recientemente.
20 La tenascina está ausente en el tejido adulto normal, pero se expresa en el estroma de una gran diversidad de tumores sólidos, tales como gliomas (Burdon, y col., cancer Res. 43: 2796-2805, 1983), tumores mamarios (*Chiquet-Ehrismann, y col, 1986*), carcinomas de pulmón (Natali y col., Intl. J. Cancer 54: 56-68, 1989), fibrosarcomas y carcinomas de células escamosas (Ramos D.M y col., Int. J. Cancer 75: 680-687, 1998). La tenascina se encuentra en gliomas, pero no en tejido cerebral normal. Para una discusión sobre tenascina, se puede hacer
25 referencia al documento WO 92/04464, Wistar, y a las referencias relacionadas.

De acuerdo con la enseñanza del documento EP 0 496 074, G. Paganelli y col. desarrollaron una estrategia de pre-marcaje como objetivo de tres etapas para el tratamiento sistémico y locorregional de los tumores (Cremonesi M y col., EUR. J. Nucl. MED. 26 (2): 110-120, 1999; Paganelli G. y col., EUR. J. Nucl. MED. 26 (4): 348-357, 1999; Paganelli G., y col. Cáncer
30 Biother. & Radiopharm. 16 (3):227-235, 2001).

Otras referencias sobre el procedimiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas son los documentos WO 94/04702 y US 5.578.287.

El tratamiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas se basa en administración intravenosa, secuencial de un anticuerpo monoclonal anti-tenascina biotinilado, esteptavidina, y biotina marcada con ⁹⁰Y con las dos administraciones de búsqueda de avidina y de albúmina
35

- biotinilada antes de estreptavidina y de biotina marcada con ⁹⁰Y, respectivamente, para reducir el fondo no específico. La selectividad del enfoque de pre-marcaje como objetivo de tres etapas de Paganelli depende del uso de un anticuerpo monoclonal anti-tenascina. El marcate como objetivo de la matriz extracelular, comparado con el marcate como objetivo de los antígenos de células tumorales, presenta la ventaja de no estar afectado por la modulación antigénica de células tumorales representando así un objetivo ideal para terapia antitumoral.
- Las dosis y la coordinación temporal de las administraciones del tratamiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas se han fijado para lograr proporción de distribución tumoral/no tumoral óptima. Los datos obtenidos a partir del glioblastoma 48 (GBM) o de los pacientes de astrocitoma anaplásico (AA), incluidos en el estudio de Paganelli, mostraron una carencia sustancial de toxicidad, con la excepción de alguna reacción alérgica a estreptavidina (que se puede superar usando avidina), y mostraron indicación preliminar de eficacia terapéutica. De hecho, 2 meses después del final de tratamiento, el 25% de los pacientes mostraron una reducción en el tamaño tumoral (Respuesta Completa (reducción tumoral >50%) = 6%;
- 15 Respuesta Parcial (reducción tumoral <50%) = 11%; respuesta Menor (reducción tumoral <25%) = 8%) y el 52% de los pacientes no hubieron progresado, con una proporción de respuesta global de por encima del 77%. En algunos de estos pacientes, cuya esperanza de vida era menos de seis meses, la respuesta persistió durante más de un año (Paganelli y col., 1999).
- 20 El papel de anticuerpo biotinilado anti-tenascina es localizar en el sitio de tumor y presentar biotinas para mediar la posterior acumulación de avidina y de ⁹⁰-Y-biotina.
- Se revelan anticuerpos anti-tenascina, por ejemplo, en los documentos US 5.624.659, Duke University, JP 2219590, Rikagaku, el documento anteriormente mencionado WO 92/04464 y en el documento US 6 335 014 que revela el uso de anticuerpos monoclonales de tenascina anti-25 humano en procedimientos de tratar y evitar metástasis. Se describe un anticuerpo anti-tenascina en Siri A. y col., Nucl. Acids Res. 19 (3): 525-531, 1991; Balza E y col., FEBS 332: 39-43, 1993 y su uso para los propósitos terapéuticos se revela en los anteriormente mencionados Cremonesi M. y col., Eur. J. Nucl. Med. 26 (2): 110-120, 1999; Paganelli G. y col., Eur. J. Nucl. Med. 26 (4): 348-357, 1999; Paganelli, G y col., Cancer Biother. & Radiopharm. 16 (3): 227-235, 2001. El clon usado para generar el anticuerpo anti-tenascina en la técnica se conoce como BC4.
- 30 El presente solicitante encontró el clon BC4 inadecuado para el desarrollo industrial y los propósitos reguladores debido a la producción de una cadena ligera adicional, no funcional (lo más probablemente de origen de mieloma parental) cuyo nivel de expresión se incrementó a la presión de cultivo de escalamiento, evitando así la purificación de anticuerpo a gran escala.

Sumario de la invención

Se ha encontrado ahora que se puede producir un anticuerpo monoclonal de tenascina anti-humano que soluciona los problemas mencionados anteriormente, a saber se puede producir un anticuerpo monoclonal que carece de la expresión de cadenas ligeras no funcionales.

- 5 Por lo tanto, este anticuerpo es un objeto de la presente invención, conjuntamente con un procedimiento para obtener dicho anticuerpo, su uso en terapia, en particular para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades caracterizado por la expresión de tenascina, tales como tumores.

Descripción de la invención

- 10 La presente invención proporciona un anticuerpo y fragmentos de anticuerpos que pueden contener también marcadores adicionales y agentes de diagnóstico, composiciones que contienen estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y las composiciones de diagnóstico y terapéuticas que los contienen, su uso en terapia y diagnósticos y procedimientos de preparar estos anticuerpo y fragmentos de anticuerpo.

- 15 La presente invención también se refiere a DNA que codifica anticuerpo y fragmentos, vectores que contienen DNA, células huésped que contienen vectores, proteína codificada por DNA que codifica proteína de SEQ ID N.^os: 1 y 2; DNA que codifica proteína y fragmentos; CDR específicas y proteínas que comprenden o que contienen CDR.

- De acuerdo con la presente invención, dicho anticuerpo se **caracteriza porque** las secuencias 20 de la región variable de las cadenas ligera y pesada son SEC ID N.^o: 1 y SEC ID N.^o: 2, respectivamente. Estas secuencias se muestran en las Figuras 10 y 11. En atención a la brevedad, el anticuerpo preferido de acuerdo con la presente invención será identificado con el nombre ST2146. Mientras que la presente invención se centra en ST2146, como ejemplificación de la presente invención, alguien de habilidad ordinaria en la técnica apreciará 25 que, una vez dada la presente divulgación, se pueden producir fragmentos de anticuerpos de ST 2146 y se pueden usar dentro el alcance de la presente invención.

- En vista del párrafo anterior, la presente invención por lo tanto proporciona un anticuerpo (en lo sucesivo también llamado ST2146) según se define en la reivindicación 1 o un fragmento de anticuerpo o una quimera de anticuerpos (tal como, por ejemplo, una quimera ratón-humano) o 30 una molécula de inmunoglobulina que une específicamente tenascina. La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o una quimera de anticuerpo según se definen en la reivindicación 2 o una molécula de inmunoglobulina que comprende al menos una de una CDR de la cadena ligera variable de ST2146 y/o una CDR de la cadena pesada variable de ST2146. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo o quimera de anticuerpos o molécula de 35 inmunoglobulina de la presente invención puede ser un anticuerpo, un fragmento Fv, un

fragmento Fab, un fragmento (Fab)₂, una cadena individual de anticuerpo, o un anticuerpo multimérico. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo o quimera de anticuerpos o molécula de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una molécula IgM, IgD, IgG, IgA, o IgE.

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o una quimera 5 de anticuerpos o una molécula de inmunoglobulina que comprende al menos una de las SEC ID N.^{os}: 1, 2, 9, 11, 13, 15, 17, o 19.

La presente invención proporciona adicionalmente las secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos de la presente invención, tales como las secuencias de SEQ ID N.^{os}: 1, 2, 9, 11, 13, 15, 17, o 19. La presente invención proporciona por lo tanto una 10 secuencia de DNA que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o una quimera de anticuerpos o una molécula de inmunoglobulina de la presente invención. Tales secuencias de DNA incluyen al menos una secuencia o subsecuencia de DNA seleccionada de SEQ ID N.^{os}: 3, 4, 10, 21, 14, 16, 18 ó 20.

Otra realización se refiere a una molécula de ácido nucleico purificada que codifica el producto 15 de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo o de quimera de anticuerpos o de molécula de inmunoglobulina de la invención. Una molécula de ácido nucleico que codifica un producto de inmunoglobulinas de la invención puede elaborarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden sintetizar usando los sintetizadores de oligonucleótidos 20 y pueden estar unidos conjuntamente para formar un marco de lectura abierto funcional que codifica un producto de inmunoglobulinas de la invención. La molécula de ácido nucleico, una vez sintetizada, se puede clonar dentro de un vector de ácido nucleico. Un vector de ácido nucleico tal como un plásmido, cósmido, fagémido, plásmido de levadura, vectores bacteriófagos, plásmido de TI y similares se conoce en la técnica. El vector puede ser un vector de expresión. Los vectores de expresión y los sistemas de expresión están disponibles 25 comercialmente de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, California).

Otra realización de la invención se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico de la invención. Una célula se puede elaborar mediante transfección. Los procedimientos de transfección se conocen y los kits para transfección de células procariotas y eucariotas se pueden adquirir de fuentes comerciales (por ejemplo, Stratagene, La Jolla, California).

30 Otra realización de la invención se refiere al uso del producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas de la invención para los medios útiles para detectar o diagnosticar un trastorno que comprende las etapas de poner en contacto una muestra de tejido de un sujeto con la condición de que permita la formación de un complejo entre dicho producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de 35 anticuerpos o de inmunoglobulinas y un antígeno de tenascina, y determinar la formación de

dicho complejo.

Otra realización de la invención se refiere al uso de un producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas de la invención o un ácido nucleico de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de

5 enfermedades que expresan tenascina, en particular tumores. Se conocen los procedimientos para inmunoterapia para el cáncer. Véase por ejemplo en Old, L.J. Immunotherapy para el cáncer, Scientific American, septiembre de 1996.

Otra realización se refiere a una composición terapéutica que comprende un producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas

10 de la invención. Los productos de inmunoglobulinas de la invención se pueden proporcionar en forma de una composición que comprende el producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica se puede usar para el tratamiento de trastornos en un mamífero tal como un ser humano. El medicamento se administrará a un
15 mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva de producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas de la invención para el mamífero.

En su uso como un agente terapéutico, el producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas de la invención puede unirse a

20 un agente. La unión puede ser por enlaces covalentes o por el enlace de anticuerpo-epitopo. Por ejemplo, un producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpo, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas puede estar formando retícula con un segundo anticuerpo en el que el segundo anticuerpo puede tener una afinidad por el agente. El agente puede ser un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se
25 refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término se desea para incluir isótopos radiactivos (por ejemplo I, Y, Pr), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animales, o fragmentos de los mismos. El agente puede ser un agente quimioterapéutico. Un agente quimioterapéutico es un compuesto químico útil en el tratamiento
30 de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Adriamicina, Doxorrubicina, 5-Fluorouracilo, Arabinósido de citosina ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Busulfán, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalán, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatina, Tenipósido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas (véase el documento
35 de patente de los Estados Unidos N.º: 4,675,187), Melfalán y otras mostazas de nitrógeno

relacionadas. El agente puede ser una citoquina. El término citoquina es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. La hormona del crecimiento está incluida entre las 5 citoquinas tal como la hormona del crecimiento humana, N-metionilo de hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glucoproteínas tales como hormona estimuladora del folículo (FSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; 10 prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de Müllerian; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento de transformación (TGF); factores I y II de crecimiento similares a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones 15 tales como interferón-alfa, -beta y -gamma, factores estimuladores de colonias (CSF); CFS de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL 1-alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el 20 presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencias nativas.

Para el diagnóstico, el producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de producto de inmunoglobulinas de la invención pueden unirse a una marca, tal como a un compuesto o a una composición detectable que está conjugado directa o 25 indirectamente al anticuerpo. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo las etiquetas de radioisótopos o las etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto sustrato o de una composición sustrato que sea detectable.

La invención también contemplaba la generación de mutantes de las CDR reveladas por la 30 realización de mutaciones, de uno o más aminoácidos en la secuencia de las CDR. Se sabe que una única sustitución de aminoácidos situada apropiadamente en una CDR puede ser suficiente para aumentar la afinidad. El investigador ha usado la mutagénesis dirigida a sitio para incrementar la afinidad de algunos productos de inmunoglobulina en aproximadamente 10 veces. Este procedimiento de incrementar o disminuir la afinidad de anticuerpos mutando CDR 35 es conocimiento común (véase, por ejemplo., el capítulo 23, Paul, W.E., Fundamental

Immunology, Raven Press, NY, N.Y. 1993). Así, la sustitución, delección, o adición de aminoácidos a las CDR de la invención para incrementar o disminuir afinidad de unión o especificidad de unión está también dentro de la contemplación de esta invención.

Un aspecto adicional de la presente invención está proporcionando un medicamento para tratar

- 5 a un individuo con un tumor, tal como tumores cerebrales quísticos, gliomas, tumores mamarios, carcinomas de pulmón, fibrosarcomas o carcinomas de células escamosas, que implican administrar a un sujeto humano afectado con el tumor como tumor cerebral quístico (p. ej., uno que expresa tenascina) un producto de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos, de quimeras de anticuerpos o de inmunoglobulinas de la presente invención que se une a
10 tenascina en una cantidad terapéuticamente efectiva. La etapa de administración puede lograrse depositando el anticuerpo en la cavidad del tumor.

También se revela en el presente documento un procedimiento de tratar un tumor sólido que comprende, primero, eliminar un tumor sólido (p. ej., uno que expresa tenascina) de un órgano de tejidos sólidos (p. ej., el cerebro) de un sujeto humano afectado; después formar una
15 cavidad de resección quirúrgica cerrada en el órgano del sujeto en la localización de la que se eliminó el tumor sólido; y después administrar al sujeto un agente antineoplásico tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una quimera de anticuerpo o un producto de inmunoglobulinas de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo que se une a tenascina) que es selectivamente tóxico para las células del tumor sólido en una cantidad
20 terapéuticamente efectiva. En una realización de la invención, la etapa de administración se lleva a cabo depositando el agente antineoplásico en la cavidad de resección quirúrgica.

Otro objeto de la presente invención son fragmentos proteolíticos de dicho anticuerpo, que se unen a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de la tenascina C humana. En el curso de la descripción de la presente invención, para fragmentos de anticuerpo se
25 desean aquellos fragmentos que se unen a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de la tenascina C humana.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo y los fragmentos del mismo pueden contener adicionalmente marcadores adicionales y/o agentes de diagnóstico adicionales. Dichos marcadores y/o agentes de diagnóstico se conocen bien por la persona experta en la
30 técnica a la que se dirige la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho anticuerpo o los fragmentos proteolíticos de los mismos están biotinilados.

Otro objeto de la presente invención es la línea celular de hibridoma, llamada en el presente documento cST2146, que produce dicho anticuerpo.

- 35 La línea celular de hibridoma se ha registrado en el Advanced Biotechnology Center, L.go

Rosanna Benzi, 10 16132 GÉNOVA-Italia, el 29 de enero de 2002 sometida a las disposiciones del Tratado de Budapest, y se le ha asignado N.^o de Acceso PD02003.

La presente invención también comprende DNA que codifica el anticuerpo o fragmentos del mismo, CDR específicas y las proteínas que comprenden o que contienen las CDR, vectores

5 que contienen dicho DNA y células huésped que contienen dichos vectores.

Otro objeto de la presente invención son los derivados recombinantes de dicho anticuerpo. En particular, los derivados recombinantes preferidos son aquellos donde la región constante murina está sustituida por la contrapartida humana (Ferrer C. y col. J. Biotechnol. 52: 51-60, 1996) o aquellos donde la región constante murina está reemplazada por un resto

10 biológicamente activo, tal como, por ejemplo, un miembro de la familia de avidina (Manuel L y col., J. Immunol., 163: 4421-4426, 1999), un factor de crecimiento útil para estimular determinantes inmunológicos dirigidos a tumores (tales como por ejemplo G-CSF, GM-CSF), o aquellos en los que la región constante murina está reemplazada por un resto farmacológicamente activo, tal como por ejemplo una toxina, un superantígeno, una citoquina o

15 cualquier otra proteína útil en potenciar la eficacia terapéutica antitumoral (Di Máximo A.M., y col., Britishs J. Cancer 75 (6): 822-828, 1997; Parente D. y col., Anticancer Research 17 (6A): 4073-4074, 1997).

Los procedimientos para obtener dichos derivados recombinantes se conocen bien en la técnica.

20 Otro objeto de la presente invención son los derivados conjugados de dicho anticuerpo.

En particular, los derivados de conjugado preferidos son aquellos donde el resto biológicamente activo está ligado al anticuerpo por medio de procedimientos convencionales.

Ejemplos de restos biológicamente activos son miembro de la familia de avidina, un factor de crecimiento útil para estimular efectores inmunológicos dirigidos a tumores (tal como por ejemplo G-CSF, GM-CSF), un resto farmacológicamente activo, tal como por ejemplo una toxina, un superantígeno, una citoquina o cualquier otra proteína útil en incrementar la eficacia terapéutica antitumoral, fármacos antitumorales, radioisótopos.

De acuerdo con la presente invención, los derivados o conjugados recombinantes de la tenascina anti-humano monoclonal o fragmentos de la misma también se indican como

30 "derivados".

En una realización más particularmente preferida de la invención, distinta del anticuerpo y de los fragmentos, también los derivados de los mismos están biotinilados.

Otro objeto de la presente invención es la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo según se define anteriormente. Dicho hibridoma se ha registrado en el Advanced Biotechnology

35 Center el 29 de enero de 2002 sometido a las disposiciones del Tratado de Budapest, con el

número PD02003.

Como un objeto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de anticuerpo monoclonal, comprendiendo dicho procedimiento cultivar la línea celular anterior de hibridoma y aislar el anticuerpo.

- 5 Otro objeto de la presente invención es el uso del anticuerpo monoclonal anti-tenascina anti-humana para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que expresa tenascina, en particular un tumor.

Una lista no limitante, ejemplificadora de tumores que expresan tenascina son gliomas, tumores mamarios, carcinomas de pulmón, fibrosarcomas y carcinomas de células escamosas.

- 10 Otro aspecto más de la presente invención es un medicamento para la radioinmunoterapia de tumores, que se administra a un sujeto que sufre de un tumor que expresa tenascina, y comprende dicho anticuerpo monoclonal o fragmentos proteolíticos, o derivados de los mismos.

En una realización preferida, dicho anticuerpo monoclonal o fragmentos o derivados proteolíticos de los mismos están biotinilados, en una realización más particularmente

- 15 preferida, el medicamento es adecuado para la radioinmunoterapia, en particular para llevar a cabo el procedimiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas, como se describe en la técnica, por ejemplo en los documentos EP 0 496 074, European Journal of Nuclear Medicine Viol. 26, N.^o: 4; abril de 1999; 348-357 y US 5,968,405. En este último aspecto, el medicamento de acuerdo con la presente invención estará en forma de un kit, estando dicho kit compuesto

- 20 de 5 viales, cuyo primer vial contiene el anticuerpo biotinilado o el fragmento o derivado biotinilado del mismo; el segundo vial contiene una avidina, el tercer vial contiene albúmina biotinilada, el cuarto vial contiene una estreptavidina, el quinto vial contiene biotina marcada radiactivamente o derivado de biotina marcado radiactivamente. Esta clase de kit se proporciona en European Journal of Nuclear Medicine Vol. 26, N.^o: 4; abril de 1999; 348-357.

- 25 Una secuencia comprende avidina, estreptavidina, PEG-avidina o PEG-estreptavidina, di- o poliavidina o di- o poliestreptavidina. Una biotina radiomarcada contiene un radionúclido, tal como se describe en el documento EP 0 496 074, preferentemente ⁹⁰Y. Los derivados de biotina se describen, por ejemplo en el documento WO 02/066075. Un kit de esta clase se describe en European Journal of Nuclear Medicine Vol. 26, N.^o: 4; abril de 1999; 348-357.

- 30 Preferentemente, los viales son adecuados para inyección a seres humanos.

Los derivados recombinantes del anticuerpo de la presente invención, así como sus conjugados se usan también convenientemente en terapia del tumor. Aunque el anticuerpo de la presente invención así como los fragmentos, derivados y conjugados del mismo se usan adecuadamente en el tratamiento de tumores relacionados con tenascina, en particular por

- 35 medio de inmunoterapia, la radioinmunoterapia es una realización preferida de la invención.

El recipiente específico, preferentemente en forma de un vial adecuado para inyección, que comprende el anticuerpo o fragmentos del mismo, en la forma biotinilada, es otro objeto de la presente invención.

En otra realización de la presente invención, en el kit terapéutico, el anticuerpo biotinilado se

5 combina con otros anticuerpos específicos de tenascina dirigidos preferentemente hacia el fragmento de A-D. Alternativamente, el anticuerpo biotinilado se combina con otros anticuerpos específicos del tumor. Una enseñanza general de dicha clase de kit se proporciona en los documentos EP 0 496 074, European Journal of Nuclear Medicine Vol. 26, N.º: 4; abril de 1999; 348-357 y US 5,968,405.

10 En particular, la presente invención también comprende un contenedor, que contiene opcionalmente compartimentos múltiples, que comprende el anticuerpo biotinilado o fragmentos o derivados del mismo, tampones y reactivos adecuados para usar en un kit terapéutico para un procedimiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas.

Otro objeto de la presente invención es el uso de dicho anticuerpo monoclonal o de dichos 15 fragmentos, o derivados recombinantes o conjugados del mismo o el derivado biotinilado del mismo, para la preparación de medios de diagnóstico, para la detección de enfermedades que expresan tenascina, en particular para formación de imagen de tumor in vivo.

En una realización particular de la presente invención, dicho anticuerpo monoclonal o fragmentos o derivados de los mismos se usa en combinación con un segundo anticuerpo 20 específico de tenascina en un ensayo en sandwich para la producción de un kit diagnóstico para la determinación del nivel de tenascina circulante. El ensayo en sandwich es, por ejemplo, un ELISA in vitro en condiciones donde dicho segundo anticuerpo se une a un segundo epitopo antigénico de tenascina, dicho ensayo de ELISA in vitro es útil para determinar el nivel de tenascina circulante.

25 Los kits de diagnóstico o terapéuticos que comprenden el anticuerpo o fragmentos o derivados del mismo son un objeto adicional de la presente invención.

Estos y otros objetos de la presente invención serán descritos en detalle en la siguiente descripción también por medio de ejemplos y figuras.

30 Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: muestra la representación esquemática de tenascina-C humana, los fragmentos y reactivos antigenicos recombinantes relacionados, así como la estrategia usada para generar un anticuerpo similar a BC-4.

Figura 2: muestra la confirmación de la naturaleza glucosídica de la variabilidad de la cadena

35 pesada de ST2146 digiriendo el anticuerpo con un sialidasa.

Figura 3 muestra homogeneidad total de ST2146 opuesta a BC4.

Figura 4 muestra la prueba de bandas de Western de unión de ST2146 a epitopo de tenascina humana comparado con el epitopo antigénico de BC4 (el carril D está vacío).

Figura 5 muestra un ELISA competitivo donde ST2146 compite fuertemente con BC4 en la
5 unión a tenascina humana mientras que ST2077 muestra sólo competición parcial. ST2077 es un anticuerpo monoclonal específico de tenascina obtenido en el procedimiento para generar ST2146. ST2077 muestra especificidad similar a ST2146 (región de repetición similar a EGF de tenascina humana) pero se refiere a un epitopo antigénico que solo interfiere parcialmente con el epitopo BC4/ST2146.

10 Figura 6 muestra la inmunorreactividad de ST2146 por ELISA en comparación con el pico totalmente activo de BC4.

Figura 7 muestra el protocolo para el estudio de biodistribución de ST2146.

Figura 8 muestra la biodistribución para ST2146 en comparación con BC4 (biot = biotinilado; IR = inmunorreactividad expresada como la cantidad de anticuerpo para obtener D.O. 1,0 en
15 ELISA).

Figura 9 muestra la proporción de tumor/no-tumor para ST2146 en comparación con BC4.

Figura 10 muestra la secuencia de la cadena ligera variable ST2146 (VL) (SEQ ID N.^os: 1 (aminoácido de longitud completa), 3 (DNA que codifica aminoácido), 9 (aminoácidos de la cadena ligera de CDR1), 10 (DNA de la cadena ligera de CDR1), 11 (aminoácidos de la cadena ligera de CDR2), 12 (DNA de la cadena ligera de CDR2), 13 (aminoácidos de la cadena ligera de CDR3), 14 (DNA de la cadena ligera de CDR3) y 21 (DNA de longitud total)).

20 Figura 11 muestra la secuencia de la cadena pesada variable de ST2146 (VH) (SEQ ID N.^os: 2 (aminoácido de longitud completa), 4 (DNA que codifica aminoácido), 15 (aminoácidos de la cadena pesada de CDR1), 16 (DNA de la cadena pesada de CDR1), 17 (aminoácidos de la cadena pesada de CDR2), 18 (DNA de la cadena pesada de CDR2), 19 (aminoácidos de la cadena pesada de CDR3), y 20 (DNA de la cadena pesada de CDR3) y 22 (DNA de longitud total)).

Descripción detallada de la invención

30 ST2146 se obtiene del clon celular de hibridoma correspondiente cST2146 como se da en detalle en el siguiente ejemplo.

Por lo que se refiere a los aspectos industriales de la presente invención, el anticuerpo desvelado en el presente documento se formulará adecuadamente en composiciones farmacéuticas o kits de diagnóstico como se hizo normalmente en este campo técnico.

35 Las composiciones farmacéuticas son convencionales en este campo y pueden fabricarse por

la persona experta en la técnica justo en base al conocimiento general común. Ejemplos de composiciones farmacéuticas se dan en las referencias mencionadas en la presente invención. Lo mismo se aplica a los kits de diagnóstico. Se prefieren particularmente en el kit para la radioinmunoterapia de tumores como se revela en los artículos mencionados anteriormente por

5 Paganelli y otros y por el documento EP 0 496 074.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo y/o un fragmento y/o un derivado recombinante y/o un conjugado del mismo en mezcla con al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables están incluidas en el alcance de la presente invención.

El siguiente ejemplo adicionalmente ilustra la presente invención.

10 Ejemplo 1

Para generar un nuevo clon celular de hibridoma con la especificidad de BC4 pero careciendo de expresión de la cadena ligera no funcional, los ratones Balb/c se inmunizaron con el lisado de fago de *Escherichia coli* pTn28. pTn28 es un clon recombinante de λgt11 que codifica un fragmento de la repetición similar a EGF de tenascina humana que muestra previamente que

15 contiene el epitopo BC4 (*Balza E y col., 1993*). La representación esquemática de tenascina-C humana, los fragmentos y reactivos antigenicos recombinantes relacionados, así como la estrategia usada generando un anticuerpo similar a BC-4 se dan en la figura 1. Los esplenocitos inmunizados pTn28 se condensaron a células de mieloma no productoras Sp2/0Ag14 por el procedimiento estándar (*Cianfriglia M. y col., Methods Enzymol. 121:193210, 1986*) y la población de hibridoma se revisó por ELISA sobre tenascina purificada de SK-MEL-

20 28 (línea celular humana de melanoma). Los hibridomas específicos de tenascina se clonaron limitando dilución dos veces en FCS que contiene medio y tres veces en medio libre de proteínas (Medio Libre de Componente Derivado de Animales HyClone, HyQ^R Perbio). El subclón cST2146/D3d/F6e finalmente se seleccionó para la producción del cST2146 Master

25 Cell Bank (MCB) y Working Cell Bank (WCB).

La producción del material de referencia de ST2146 se hizo por cultivo de células de hibridoma cST2146 en Biorreactor 2L y la estabilidad del cST2146 Post Production Cell Bank (PPCB) se confirmó por análisis de FACS y por Dilución Limitante.

ST2146 es una inmunoglobulina de ratón del isótipo IgG2b/k.

30 ST2146 demostró ser homogéneo para la composición de cadena ligera como se muestra por análisis de SDS-PAGE reductor que también mostró un cierto grado de heterogeneidad de la cadena pesada. Esta observación fue consistente con una variabilidad en la glucosilación O-ligada como se comunica previamente para el isótipo IgG2b murino (*Kim H y col., J. Biol. Chem. 269 (16): 12345-12350, 1994*). La consistencia en el modelo de las bandas de la cadena pesada ST2146 se observó en tres lotes diferentes obtenidos de FCS que contienen medio de

cultivo o medio libre de proteínas. La confirmación de la naturaleza glucosídica de la variabilidad de la cadena pesada ST2146 se produjo digiriendo el anticuerpo con una sialidasa. El ST 2146 se sometió a intercambio de tampón con una columna de desalación de HiTrap (Amersham-Pharmacia), a tampón de fosfato de sodio 10 mM contenido NaCl 150 mM, pH 5 6,4. El Mab se concentró en centricons 100.000 MWCO (Millipore) a una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml y se digirió con 1,5 U/ml de sialidasa (Sigma) durante 24 horas a 37°C. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de bloque de poliacrilamida al 12%. La tinción del gel se hizo por Azul Brillante de Coomassie. Como se esperaba, esta digestión dio como resultado la eliminación de la banda de peso molecular más alto (Figura 2). La 10 homogeneidad total de ST2146 también se confirmó por cromatografía de la hidroxilapatita que mostró un pico individual para ST2146 opuesto a los tres picos observados para BC4 (Figura 3, en la que, para BC4 lo totalmente funcional corresponde al pico 3).

ST2146 une tenascina humana a un epitopo relacionado estrictamente, si no idéntico, al epitopo antigénico de BC4 como se muestra por prueba de bandas de Western (Figura 4) y 15 ELISA competitivo (Figura 5). En la Figura 5, BC4 biotinilado se mezcló con concentraciones crecientes de BC4, de ST2077 o de ST2146 como competidores y se plaqueó en placas revestidas de tenascina. La unión se midió después de la adición de HRP-estreptavidina y de sustrato cromogénico relacionado. ST2077 es un anticuerpo que reconoce un epitopo de tenascina dentro de la repetición similar a EGF, parcialmente compartido con el epitopo de 20 BC4.

La inmunorreactividad del ST2146 se evaluó por ELISA en comparación con el pico totalmente activo de BC4 (pico 3). Figura 6 muestra que la cantidad de ST2146 obteniendo D.O. 1,0 en ELISA de concentración antigénica óptima (panel A) es aproximadamente 20 veces menos que la cantidad del pico 3 totalmente reactivo de BC4 y aproximadamente 100 veces menos que 25 BC4. Esta diferencia se amplifica de forma impresionante en condiciones de limitación de antígenos como en el panel B donde sólo ST2146 mantiene una buena inmunorreactividad. La afinidad de ST2146 se evaluó por BIACore. La KD de ST2146 resultó de $1,4 \times 10^{-9}$ ($K_a 3,0 \times 10^5$; $k_d 4,1 \times 10^{-4}$). Los datos de afinidad de ST2146 se compararon con BC4 que muestra una KD de $4,9 \times 10^{-9}$ ($K_a 1,9 \times 10^5$; $k_d 9,3 \times 10^{-4}$). El mantenimiento de inmunorreactividad tras 30 biotinilación es una característica fundamental de un anticuerpo monoclonal que se usa pre-marcando. Para evaluar el comportamiento de ST2146 biotinilado se investigaron proporciones anticuerpo:biotina diferentes y se midió la inmunoreactividad de anticuerpo biotinilado por ELISA en comparación con BC4 y ST1897, siendo el último un anticuerpo monoclonal específico de tenascina con afinidad más baja. Los resultados en la tabla 1 muestran que la 35 biotinilación baja (2-3 biotinas/mol) afecta ligeramente a inmunorreactividad de anticuerpos

monoclonales independientemente de sus afinidades. Una biotinilación más alta, hasta 20 biotinas/mol está asociada a una reducción en inmunorreactividad. Esta reducción es más alta cuanto más baja es la afinidad del anticuerpo.

Tabla 1 Estudio de Biotinilación en ST2146

5

Mab	Afinidad (nm)	% de Inmunorreactividad			
		2-3	3,5-5	7-10	15-20
ST1897	10	84,8 +/-1,3	62,3 +/-12,4	26,65 +/-13,8	9,45 +/-9,26
BC4	4,9	82,4 +/-11,5	74,4 +/-9,3	67,2 +/-12,3	12,6
ST2146	1,4	100	89,6 +/-4,39	77,63 +/-8,59	52,37 +/-3,95

% de inmunorreactividad es la media de 2-3 experimentos independientes +/- desviación estándar.

La afinidad de ST2146 biotinilado se midió mediante BIACore y resultó mantenida sustancialmente no importa el número de biotinas ligadas.

La inmunohistoquímica en tumores diferentes (de mama, glioma, de colon) mostró para BC4 y 10 ST2146 selectividad similar.

El comportamiento de la farmacología del ST2146 biotinilado se dirigió estableciendo la capacidad para localizar a las masas tumorales. Los estudios de biodistribución de ST2146 marcado con ¹²⁵I y de anticuerpos biotinilados de BC4 se hicieron en ratones inmunodeficientes injertados con tenascina que expresa tumores humanos de acuerdo con el protocolo en la 15 Figura 7. Los ratones recibieron subcutáneamente 4 x 10⁶ células de carcinoma de colon humanas HT29 en 0,1 ml de solución estéril. Después de 15 días, cuando la masa tumoral era aproximadamente de 100 mg, los grupos de 5 ratones recibieron intravenosamente BC4 marcado con ¹²⁵I, ST2146 o inmunoglobulinas de ratones normales (nMlg) a 10, 2, 0,5 ó 0,1 20 µg/ratón en 0,1 ml de PBS estériles. Todos los anticuerpos se biotinilaron (7-10 biotinas/mol) y ST2146 y Mabs biotinilados BC4 mostraron un inmunorreactividad de aproximadamente el 80%. Cada animal recibió la cantidad de CPM siguiente:

Dosis	BC4	ST2146	NMlg
10 µg	632,000	570,000	577,00
2 µg	555,000	639,000	624,00
0,5 µg	310,000	401,000	382,00
0,1 µg	186,000	211,000	174,00

Los resultados en la figura 8 muestran que BC4 y ST2146 localizan específicamente masa 25 tumoral. La cantidad de ambos anticuerpos en el sitio de tumor (expresado como el % de la dosis/gramo inyectada de tejido) es dependiente de dosis con una tendencia en acumulación

más alta para ST2146. Además, ST2146 muestra una mejor proporción de tumor/no tumor comparada con BC4 tal como se muestra en la Figura 9.

La región variable de la cadena ligera de tipo Kappa se amplificó de cDNA circularizado usando un par de cebadores (5'-TGTCAA-GAGCTTCAACAGGA (SEC ID N.^o: 5), 5'-

5 AAGATGGATACAGTTGGTGC (SEC ID N.^o: 6) que se fusionan a la región constante del anticuerpo como se describe en M. Sassano y col, Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769.

La región variable de cadena pesada gamma se amplificó a partir de cDNA circularizado usando los cebadores siguientes: oligo de ratón γ 2bCH1 GTCACTGACTCAGGGAAAGTAGCC (SEC ID N.^o: 7); oligo de ratón γ 2bCH3 GCAACGTGAGACACGAG-GGTCTG (SEC ID N.^o: 8)

10 que se fusionan a la región constante del anticuerpo como se describe en M. Sassano y col. Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769.

La PCR se llevó a cabo usando las siguientes condiciones: 1 min a 94 °C, 1,5 minutos a 60 °C, 2 minutos a 72 °C durante 30 ciclos.

Los fragmentos amplificados se clonaron directamente en el plásmido pUC18 cortado por

15 SmaI. Se secuenciaron dos clones que contenían la cadena ligera kappa y 4 clones que contenían las regiones variables de la cadena pesada gamma.

La secuenciación se llevó a cabo en MWG Biotech, Alemania. Ambas hebras se secuenciaron.

No se encontraron ambigüedades.

Figura 10 muestra la secuencia de la cadena ligera variable (VL) de ST2146. La Figura 11

20 muestra la secuencia de la cadena pesada variable (VH) de ST2146.

La caracterización comparativa total de ST2146 hacia BC4 muestra que ST2146 tiene las características siguientes:

- anticuerpo monoclonal similar a BC4 con respecto a especificidad de epitopos;

- homogéneo con respecto a la composición de cadena pesada y ligera;

25 - heterogéneo con respecto a glucosilación de la cadena pesada;

- superior a BC4 con respecto a inmunorreactividad como se espera en base a la heterogeneidad de BC4;

- aproximadamente 3 veces superior a BC4 con respecto a afinidad;

- superior a BC4 con respecto al mantenimiento de inmunorreactividad tras biotinilación;

30 - similar a BC4 para selectividad en inmunohistoquímica;

- superior a BC4 con respecto a señalizar como objetivo al tumor.

LISTA DE REFERENCIAS

35 Balza E., Siri A., Ponassi M., Caocci F., Linnala A., Virtanen I., Zardi L. Production and

- characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. FEBS 332:39-43, 1993.
- Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolero F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. Biochemical modifications of 5 avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. British Journal of Cancer 78(2): 189-197, 1998.
- Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D., Massone A., Lafata M., Presentini L. and Antoni G. Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of monoclonal antibodies obtained. Methods Enzymol 121:193-210, 1986.
- 10 Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. Eur J Nucl Med 26(2):110-120, 1999.
- Di Massimo AM., Di Loreto M., Pacilli A., Raucci G., D'Alatri L., Mele A., Bolognesi A., Polito L., Stirpe F. and De Santis R. Immunoconjugates made of an anti EGF-receptor Monoclonal 15 Antibody and Type 1 RIPs from Saponaria ocyoides or Vaccaria pyramidata. British J. Cancer 75(6):822-828, 1997
- Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from 20 filamentous fungus Aspergillus clavatus. Anticancer Research 17 (6A):4073-4074, 1997
- Kim H, Yamaguchi Y, Masuda K, Matsunage C, Yamamoto K, Irimura T, Takahashi N, Kato K, Arata Y. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. J Biol Chem 269(16):12345-12350, 1994.
- Ferrer C., Anastasi A.M., Di Massimo A.M., Bullo A., Di Loreto M., Raucci G., Pacilli A., 25 Rotondaro L., Mauro S., Mele A. and De Santis R. Expression and characterization of a mouse/human chimeric antibody specific for EGF receptor. J. Biotechnol. 52: 51-60, 1996
- Manuel L. Penichet,* Young-Sook Kang, † William M. Pardridge, ‡ Sherie L. Morrison,* and Seung-Uon Shin. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV 30 Antisense Drug Delivery to the Brain 1. J Immunol 163: 4421-4426, 1999.
- Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurruda S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. Eur J Nucl Med 26(4):348-357, 1999.
- Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana 35 C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy

with 90Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother & Radiopharm* 16(3):227-235, 2001.

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a

5 single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*. *Anticancer Research* 17 (6A):4073-4074, 1997

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> DE SANTIS, RITA

ANASTASI, ANNA MARIA

<120> ANTICUERPO MONOCLONAL DE ANTI-TENASCINA HUMANA

<130> 2818-141

<140>

20 <141>

<150> 60/359.299

<151> 26-2-2002

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

25

<210> 1

<211> 142

<212> Proteína

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia de proteínas de la región variable de la cadena ligera de ST2146 sintética

<400> 1

35

Met	Arg	Cys	Leu	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	Ile	Pro
1					5				10				15		
Gly	Ala	Ile	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Pro
					20			25				30			
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser
					35			40			45				
Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg
					50			55			60				
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala
					65			70			75			80	
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe
					85			90			95				
Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr
					100			105			110				
Cys	Met	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys
					115			120			125				
Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile		
					130			135			140				

<210> 2

<211> 120

5 <212> Proteína

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia de proteínas de la región variable de la cadena pesada de ST2146 sintética

10

<400> 2

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

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

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 426

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia de cDNA de la región variable de la cadena pesada de ST2146 sintética

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(426)

15 <400> 3

```

atg agg tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct 48
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1      5          10          15
                               .
gga gcc att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct 96
Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
 20        25          30

```

gtc act cct gga gag tca tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt		144
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser		
35	40	45
ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc cta cag agg		192
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg		
50	55	60
cca ggc cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc		240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala		
65	70	75
tca gga gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc		288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe		
85	90	95
aca ctg aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac		336
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr		
100	105	110
tgt atg caa cat cta gaa tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag		384
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys		
115	120	125
ctg gag ctg aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc		426
Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile		
130	135	140

<210> 4

<211> 360

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia de cDNA de la región variable de la cadena pesada de ST2146 sintética

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

15 <400> 4

aag	gtg	aaa	ctg	cag	cag	tct	gga	cct	gag	ctg	gtg	aag	cct	ggg	gct	48
Lys	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1			5					10				15				
tca	gtg	aag	gta	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggt	tat	gca	ttc	act	agc	tac	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Ser	Tyr	
20			25						30							
aac	atg	tac	tgg	gtg	aag	cag	agc	cat	gga	aag	agc	ctt	gag	tgg	att	144
Asn	Met	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
.35					40					45						
gga	tat	att	gat	cct	tac	aat	ggt	gtt	act	agc	tac	aac	cag	aag	ttc	192
Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gly	Val	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
50			55						60							
aag	ggc	aag	gcc	aca	ttg	act	gtt	gac	aag	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	240
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65			70						75				80			
atg	cat	ctc	aac	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gca	gtc	tat	tac	tgt	288
Met	His	Leu	Asn	Ser	Ieu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
85			90						95							
gca	aga	ggg	ggc	ggt	agt	atc	tac	tat	gct	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa	336
Ala	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
100			105						110							
ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca								360	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
115			120													

<210> 5

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

10

<400> 5

tgtcaagagc ttcaacggga 20

15 <210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

5 <400> 6

aagatggata cagttggtgc

20

<210> 7

10 <211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

15

<400> 7

gtcactgact caggaaagta gcc

23

20 <210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

<400> 8

gcaacgtgag acacgagggt ctg

23

30

<210> 9

<211> 16

<212> Proteína

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia peptídica CDR1 de la región variable de cadena ligera de ST2146 sintética

<400> 9

5

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 10

<211> 48

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de CDR1 de la región variable de cadena ligera de ST2146 sintética

15

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

20 <400> 10

agg tct agt aag agt ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat 48
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 11

25 <211> 7

<212> Proteína

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia peptídica CDR2 de la región variable de cadena ligera de ST2146 sintética

<400> 11

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 12

5 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de CDR2 de la región
variable de cadena ligera de ST2146 sintética

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

15

<400> 12

cgg atg tcc aac ctt gcc tca
Arg Met Ser Asn Ieu Ala Ser
1 5

21

20 <210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia peptídica CDR3 de la región variable de
cadena ligera de ST2146 sintética

<400> 13

30 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de CDR3 de la región

5 variable de cadena ligera de ST2146 sintética

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(27)

10

<400> 14

atg caa cat cta gaa tat ccg ctc acg
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

27

15 <210> 15

<211> 5

<212> Proteína

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia peptídica CDR1 de la región variable de cadena pesada de ST2146 sintética

<400> 15

25 Ser Tyr Asn Met Tyr

1 5

<210> 16

<211> 15

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de CDR1 de la región

variable de cadena pesada de ST2146 sintética

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(15)

<400> 16

agc tac aac atg tac
Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5

15

10

<210> 17

<211> 17

<212> Proteína

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia peptídica CDR2 de la región variable de cadena pesada de ST2146 sintética

<400> 17

20

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

<210> 18

<211> 51

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de CDR2 de la región variable de cadena pesada de ST2146 sintética

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 18

tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc aag	48
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys	
1 5 10 15	

ggc	51
Gly	

5

<210> 19

<211> 11

<212> Proteína

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia peptídica CDR3 de la región variable de cadena pesada de ST2146 sintética

15 <400> 19

Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1	5	10
---	---	----

20 <210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de CDR3 de la región variable de cadena pesada de ST2146 sintética

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(33)

<400> 20

ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac
Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

33

<210> 21

5 <211> 773

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de la región variable de la
cadena ligera de ST2146 sintética

<220>

<221> CDS

<222> (292)..(717)

15

<400> 21

cgaggatccc ctgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt agagacaaag gtcctgagac

60

gccaccacca gtcggccatc tccatcctat cttcccttct aaggcttgg aggctcccc 120
 acaagcgacc taccactgtt gcgggtgcctcc aaacctccctc cccaccccttct tcctccctc 180
 ctccccttcc ttggctttta tcatacgtaat atttgcagaa aatattcaat aaagtggagtc 240
 tctgcaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaataaccc cttgataagg aagttctcag a atg agg 297
Met Arg
1

 tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct gga gcc 345
 Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro Gly Ala
5
10
15

 att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct gtc act 393
 Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr
20
25
30

 cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc ctg 441
 Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
35
40
45
50

 cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc cta cag agg cca ggc 489
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly
55
60
65

 cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc tca gga 537
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly
70
75
80

 gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc aca ctg 585
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
85
90
95

 aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac tgt atg 633
 Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met
100
105
110

 caa cat cta gaa tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag 681
 Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
115
120
125
130

 ctg aaa cgg gct gat gct gca act gta tcc atc ttgggttacccg 727
 Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
135
140

 agctcgaatt cgtaatcatg tcatacgctgt ttccctgtgt aaatttg 773

<210> 22

<211> 360

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de ST2146 sintética

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 22

aag gtg aaa ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct	48
Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tat gca ttc act agc tac	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att	144
Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc	192
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt	288
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac tgg ggc caa	336
Ala Arg Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
100 105 110	
ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca	360
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

REIVINDICACIONES

1. El anticuerpo monoclonal anti-tenascina humana cuyas secuencias de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera son SEC ID N.^º: 1 y SEC ID N.^º: 2, respectivamente, y los fragmentos proteolíticos de los mismos que se unen a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de tenascina humana C.
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal contra tenascina C humana, cuya región variable de la cadena ligera comprende secuencias de aminoácidos de SEC ID N.^º: 9, SEC ID N.^º: 11 y SEC ID N.^º: 13 y la región variable de cadena pesada comprende las secuencias de 10 aminoácidos: SEC ID N.^º: 15, SEC ID N.^º: 17 y SEC ID N.^º: 19, o un fragmento de dicho anticuerpo monoclonal, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de la tenascina C humana.
- 15 3. El anticuerpo y los fragmentos del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 contienen adicionalmente marcadores adicionales y/o agentes de diagnóstico.
4. Un anticuerpo biotinilado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que se une a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de tenascina C humana.
- 5 5. La línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-tenascina humana que se une a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de 20 tenascina C humana, registrada en el Advanced Biotechnology Center en el 29 de enero de 2002 sometida a las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número PD02003.
6. Un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de la reivindicación 5.
7. El procedimiento para la preparación del anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende cultivar el hibridoma de la reivindicación 5 y aislar dicho anticuerpo.
8. Uso del anticuerpo o de fragmentos del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el anticuerpo o fragmento biotinilado de la reivindicación 4 para la preparación de medios de diagnóstico para la detección de enfermedades que expresan tenascina.
9. Uso de la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad es un tumor.
10. Uso de la reivindicación 9, en el que dicho tumor se selecciona del grupo constituido por gliomas, tumores mamarios, carcinomas de pulmón, fibrosarcomas y carcinomas de células escamosas.
11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que dicho medios de diagnóstico se usan en técnicas de formación de imagen in vivo.
12. Uso del anticuerpo o de fragmentos del mismo de cualquiera de las

reivindicaciones 1-3 o el anticuerpo o fragmento biotinilado de la reivindicación 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores que expresan tenascina.

5 **13.** Uso de la reivindicación 12, en el que dicho tumor está seleccionado del grupo constituido por tumores cerebrales quísticos, gliomas, tumores mamarios, carcinomas de pulmón, fibrosarcomas y carcinomas de células escamosas.

14. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que dicho medicamento está en forma de un kit adecuado para llevar a cabo el procedimiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas.

10 **15.** El kit terapéutico compuesto de 5 viales, cuyo primer vial contiene el anticuerpo o fragmento biotinilado de la reivindicación 4, el segundo vial contiene una avidina, el tercer vial contiene albúmina biotinilada, el cuarto vial contiene una estreptavidina, el quinto vial contiene biotina radiomarcada o derivado de biotina radiomarcado.

16. El kit terapéutico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dichos viales son adecuados para inyección a humanos.

15 **17.** DNA que codifica el anticuerpo o los fragmentos del mismo de la reivindicación 1 ó 2.

20 **18.** Proteínas que comprenden o que contienen CDR que se unen a un epitopo antigénico dentro de la repetición similar a EGF de tenascina C humana que tiene las secuencias de aminoácidos: SEQ ID N.º: 9, SEC ID N.º: 11 y SEC ID N.º: 13 y las secuencias de aminoácidos: SEQ ID N.º: 15, SEC ID N.º: 17 y SEC ID N.º: 19.

19. Vector que contiene DNA de la reivindicación 17.

20. Células huésped que contienen vectores de la reivindicación 19.

25 **21.** Uso de anticuerpo o fragmentos del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en combinación con un segundo anticuerpo específico de tenascina en un ensayo de sandwich para la producción de un kit diagnóstico para la determinación del nivel de tenascina circulante.

22. Kit diagnóstico que comprende el anticuerpo o los fragmentos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

30 **23.** Un envase que comprende el anticuerpo biotinilado o fragmentos biotinilados del mismo de la reivindicación 4, tampones y reactivos adecuados para usar en un kit terapéutico para un procedimiento de pre-marcaje como objetivo de tres etapas.

24. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 23, que contiene compartimentos múltiples.

35 **25.** El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23-24, que comprende adicionalmente un anticuerpo específico de tenascina separado dirigido

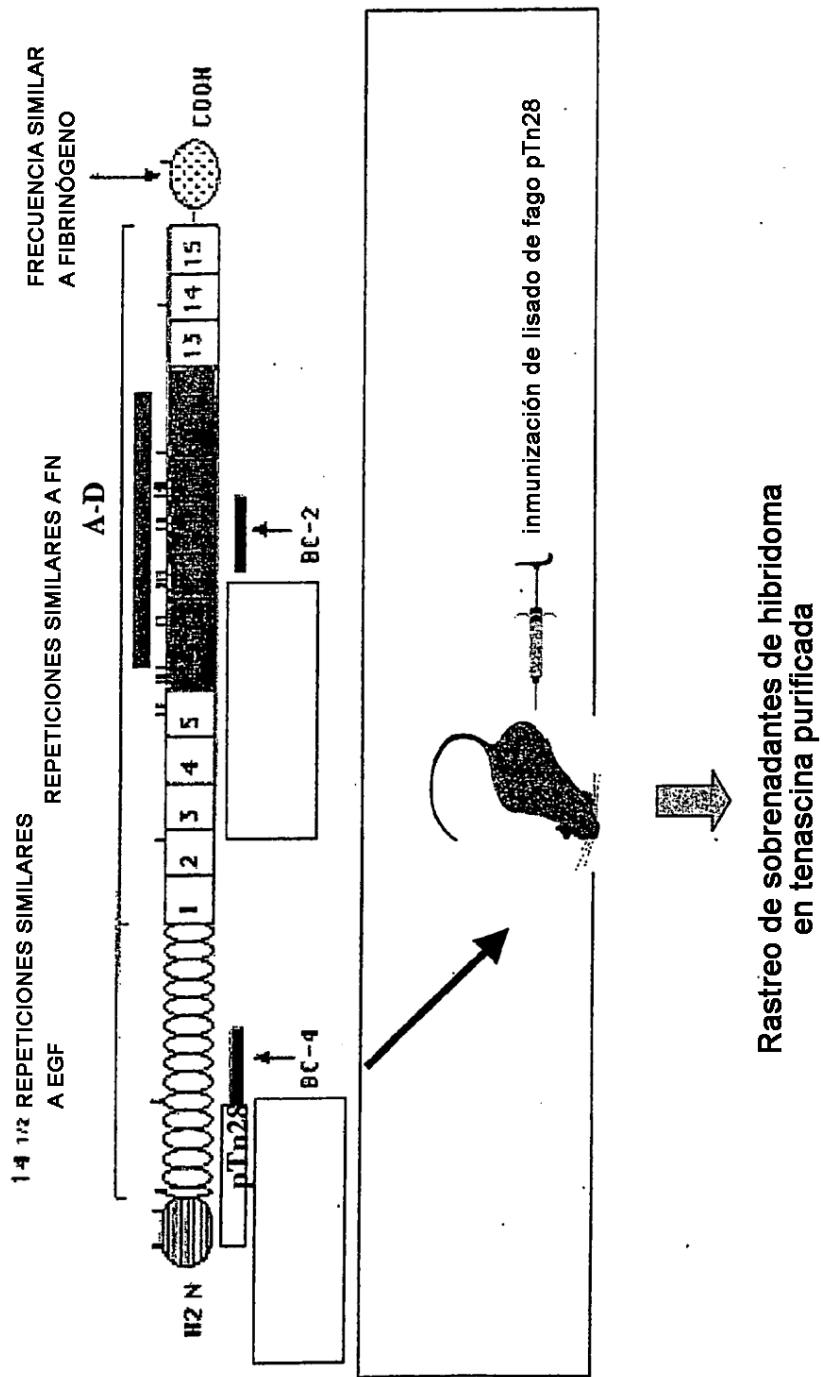
preferencialmente hacia el fragmento de A-D.

26. El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23-24, que comprende adicionalmente un anticuerpo específico de tumores separado.

27. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-3 en combinación con un segundo anticuerpo específico de tenascina en un ensayo in vitro de ELISA en sandwich en condiciones donde dicho segundo anticuerpo se une a un segundo epitopo antigénico de tenascina, siendo dicho ensayo de ELISA in vitro útil para determinar el nivel de tenascina circulante.

28. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo y/o un fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en mezcla con al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1: Representación Esquemática de la tenascina-C humana y estrategia para generar anticuerpos similares a BC-4



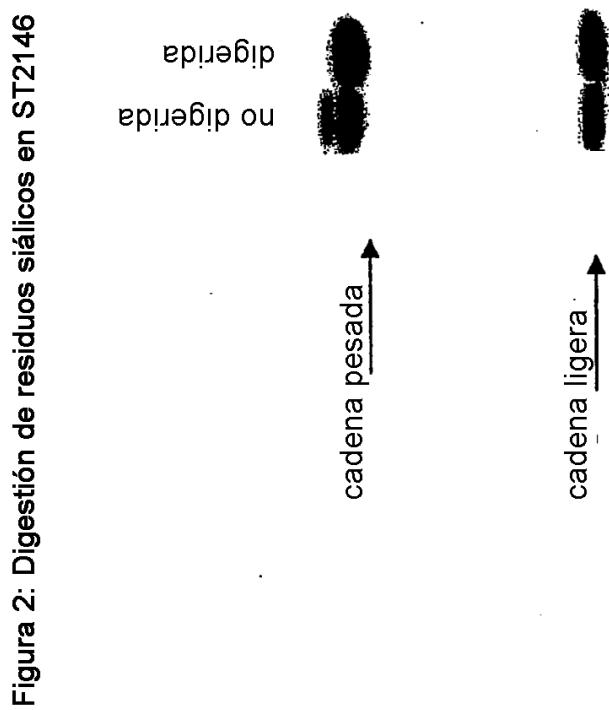
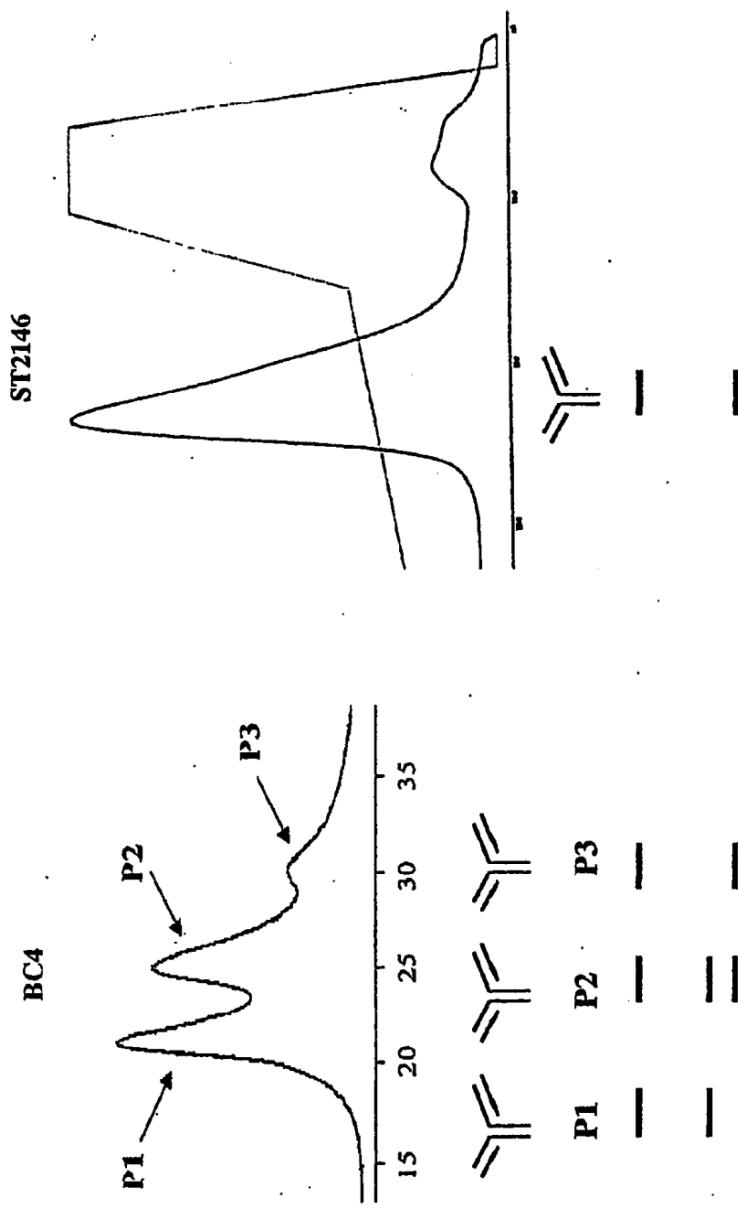


Figura 2: Digestión de residuos sialícos en ST2146

ST2146 se sometió a intercambio de tampón con una columna de desalinización HiTrap (Amersham-Pharmacia), a tampón de fosfato de sodio 10 mM que contiene NaCl 150 mM, pH 6,4. El Mab se concentró en centricons 100 000 MWCO (Millipore) a una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml y se digirió con 1,5 U/ml de sialidasa (Sigma) durante 24 horas a 37°C. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de bloque de poliacrilamida al 12%. La tinción del gel se hizo por Azul Brillante de Coomassie.

Figura 3: Cromatografía de hidroxilapatita de Mab anti-tenascina BC4 y ST2146



Nota: la cadena ligera roja se encontró que no era funcional. Por lo tanto, BC4 totalmente funcional corresponde sólo al pico 3.

Figura 4: análisis de prueba de bandas de Western de anticuerpos anti-tenascina

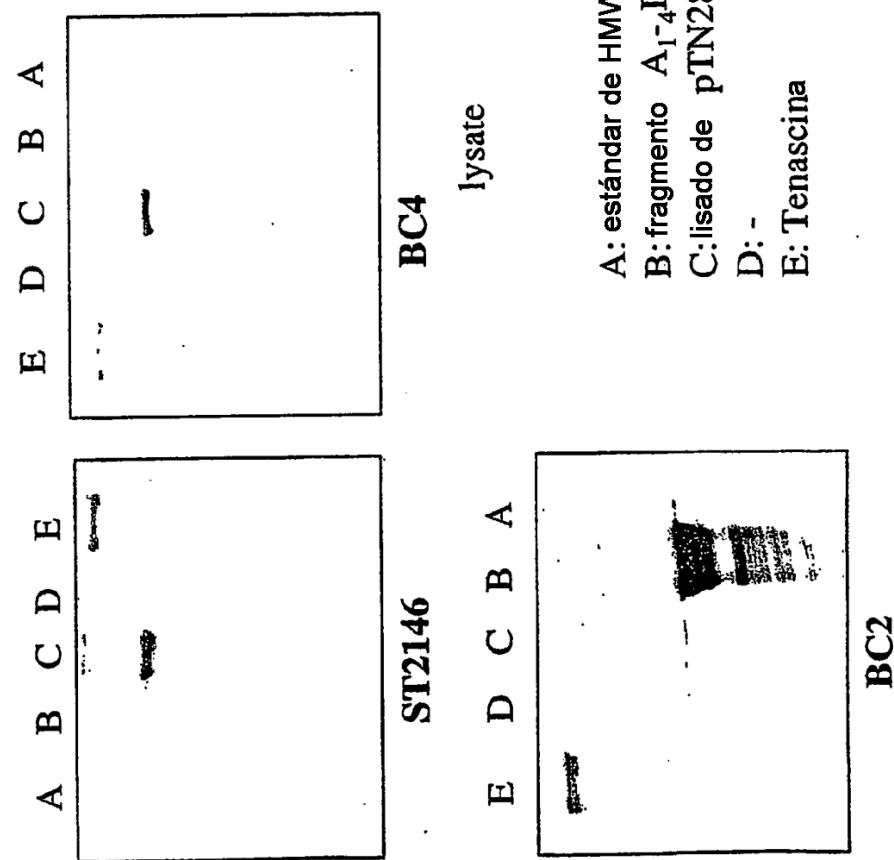
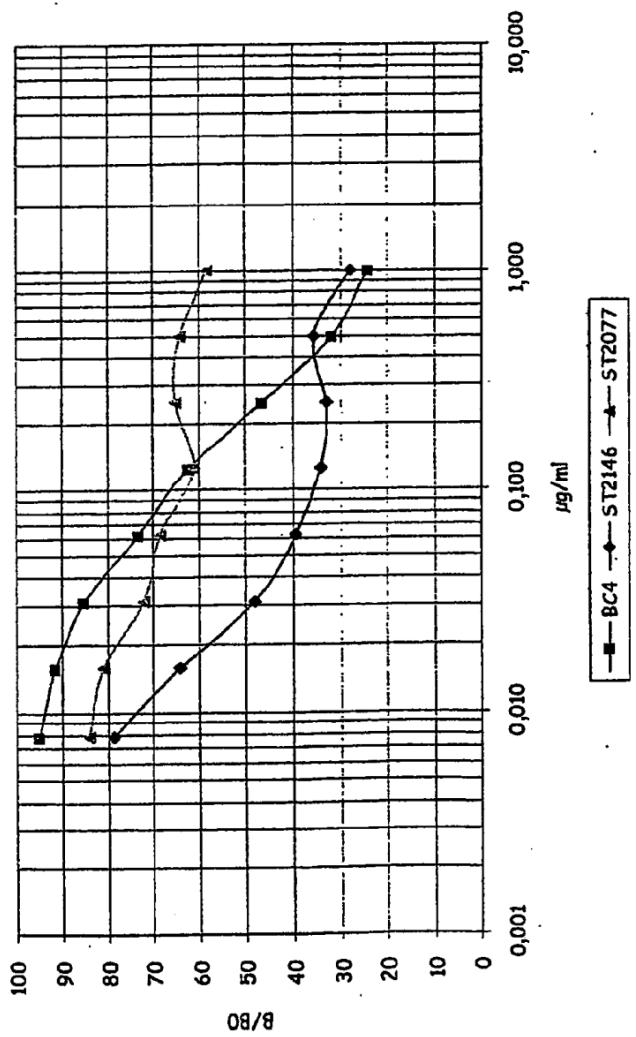


Figura 5: ELISA competitivo de ST2146



BC4 biotinilado se mezcló con concentraciones crecientes de BC4, ST2077 o ST2146 como competidores y se plaqueó en placas revestidas de tenascina. La unión se midió después de adición de la HRP-estreptavidina y sustrato cromogénico relacionado. ST2077 es un anticuerpo que reconoce un epitopo de tenascina dentro de la repetición similar a EGF, parcialmente compartido con el epitopo BC4.

Figura 6: Inmunorreactividad de ST2146 y BC4

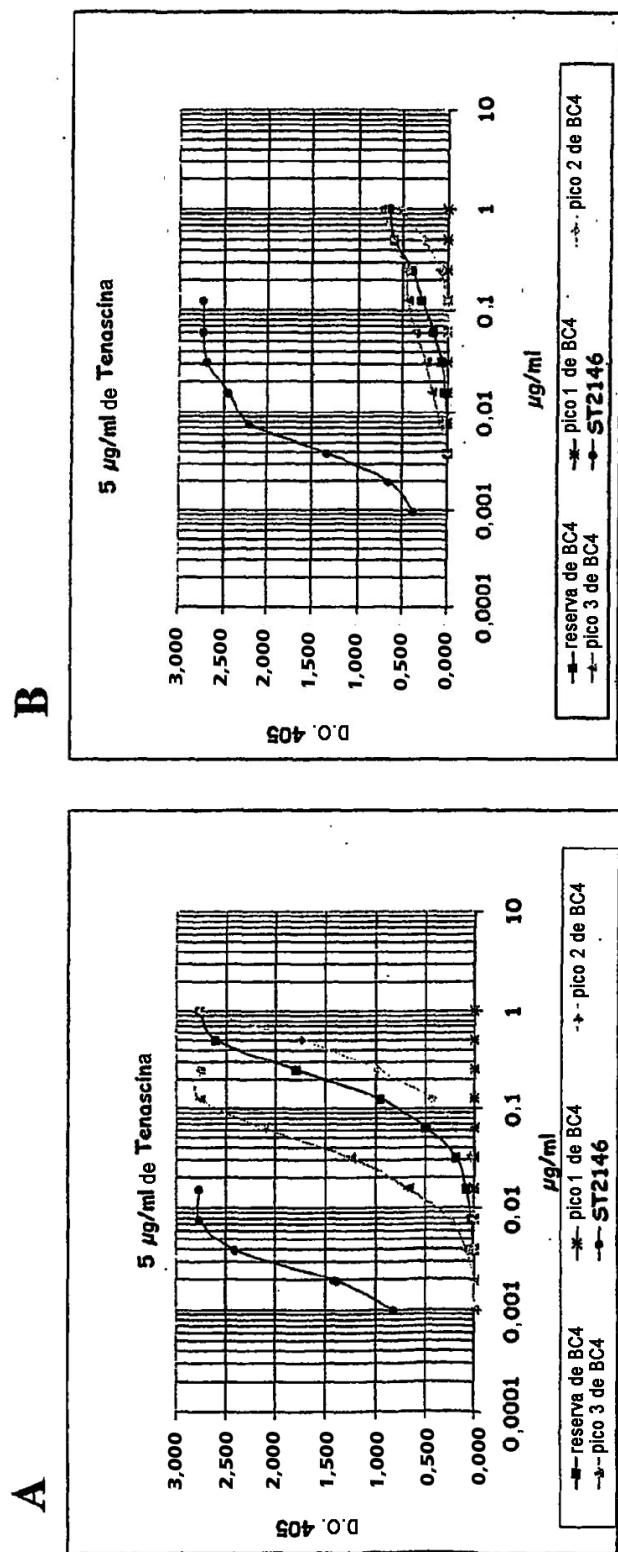


Figura 7: protocolo para estudio de biodistribución de los Mab ST2146 y BC4 biotinilados en ratones inmunológicamente deficientes injertados con tumores.

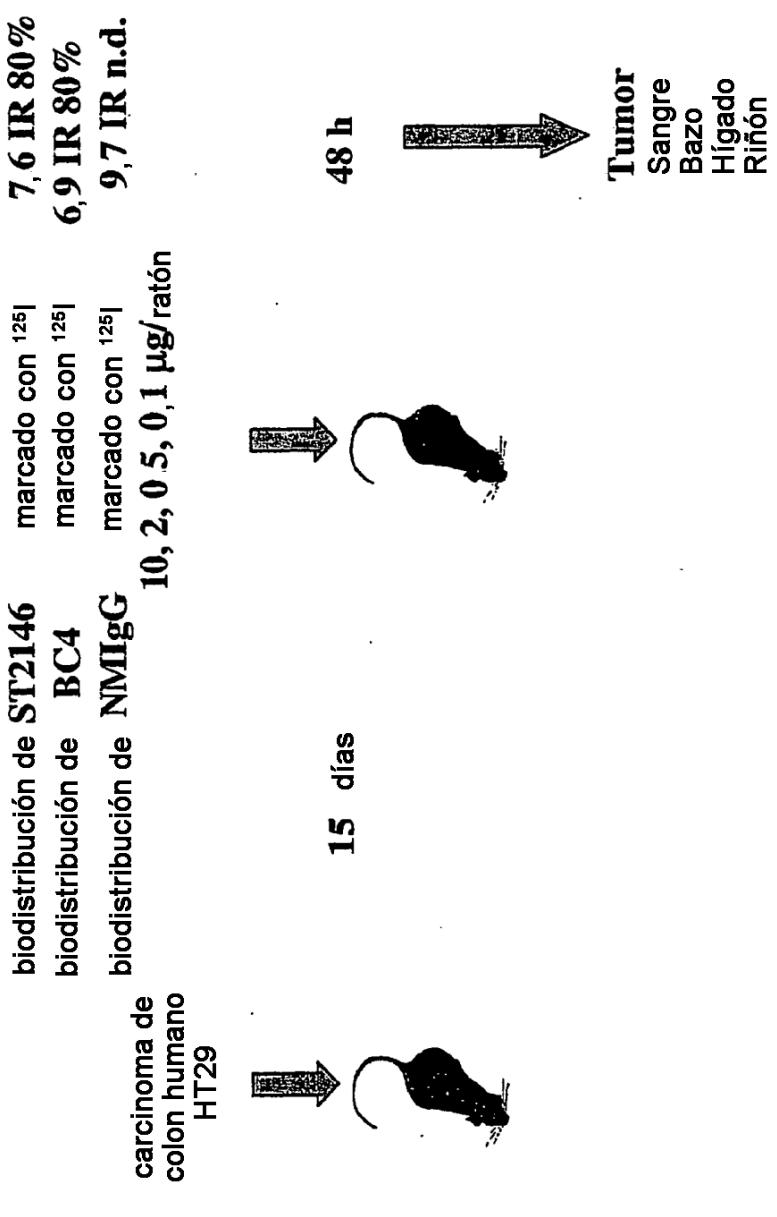


Figura 8: Biodistribución de Mabs biotinilados ST2146 y BC4 en ratones inmunológicamente deficientes injertados con tumores

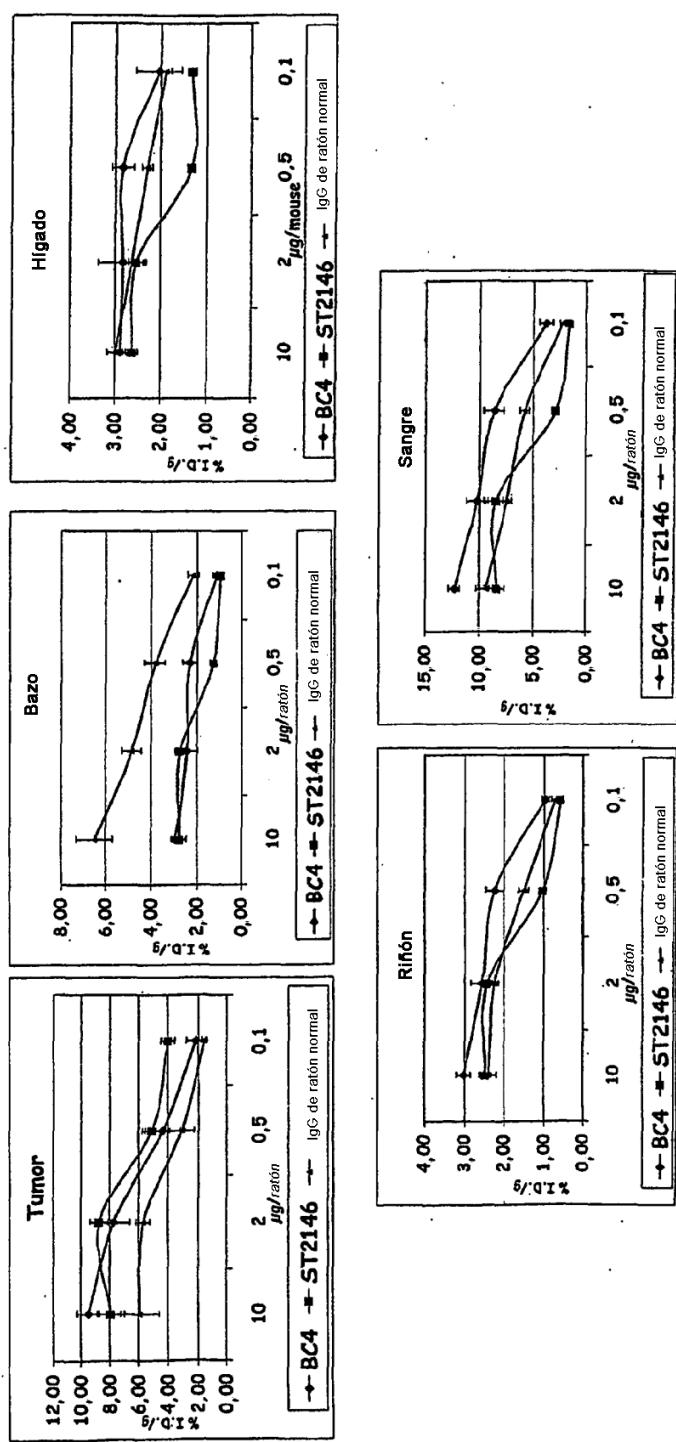


Figura 9: Proporción Tumor/no Tumor de Mabs biotinilados ST2146 y BC4 en ratones immunológicamente deficientes infectados con tumores

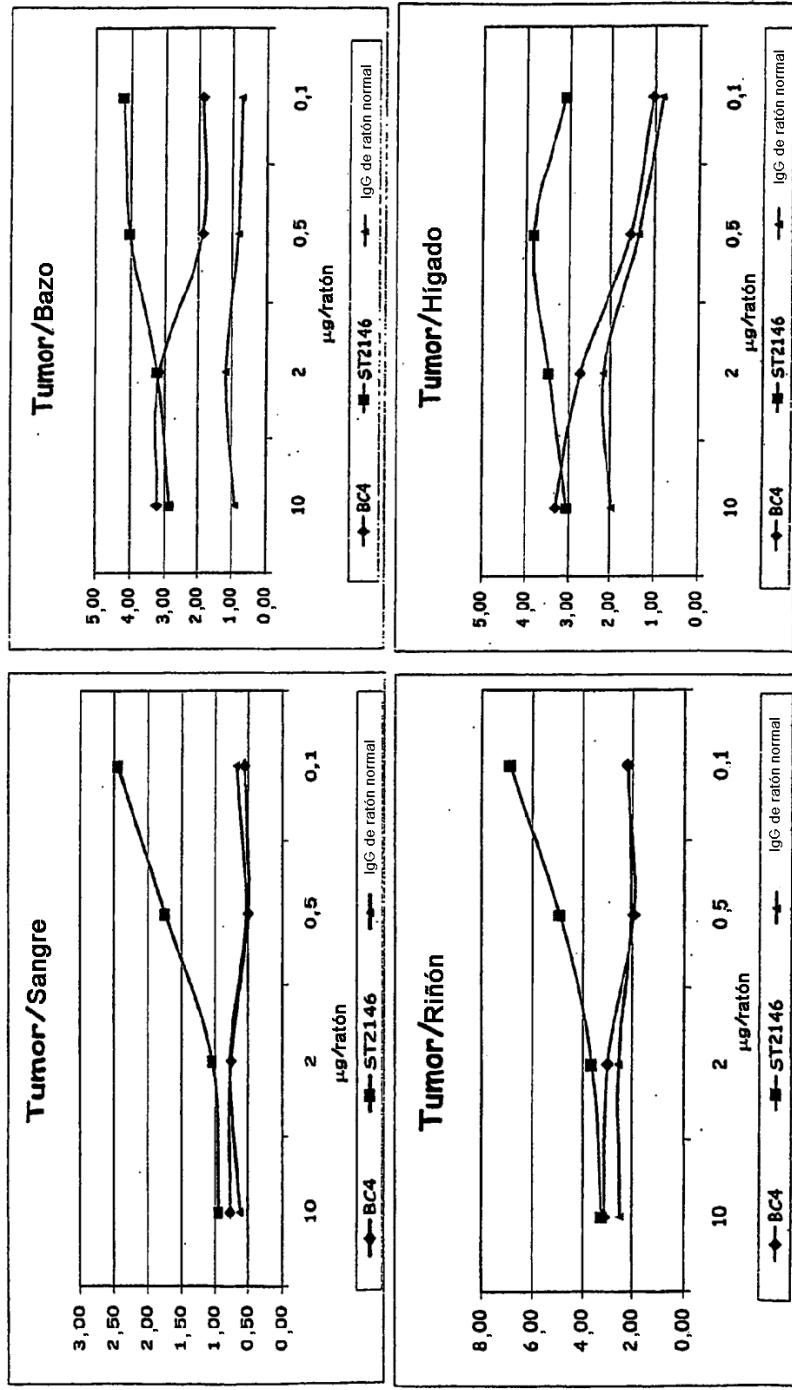


Figura 10: Secuencia de cDNA variable de la cadena ligera de ST2146 y secuencia de aminoácidos deducida

CDR3
puC18 oligo de rastro kb
 CGAGGATCCCGTGTCAAGAGCTTCACAGGGATGAGTTAGAGACAAAGGCTCTGAGACGCCACCAAGCTCCCCAGCTCATCCTAT 90

3'UTR
 CTTCCCTTAAGGTCTGGGTTCCCAAGCGACCCTAACAGGGTGCCTCAAACCTCCCTCCACCTCTCTCTCTCTCCCTC 180

 CTCCCTTCTGGCTTTATCATGCTAATATTGCAAGAAAATTCAATAAAAGTGAGTCCTCTGCAAAAAAAATAACCC 270

peptido señal
 CTTGATAAGGAAGTTCTCAGATGAGGTGCCCTAGCTGAGTTCC TGGGGCTGCTTGTGCTGGGATCTGGGATATTG TG 360
 [Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Val Leu Val Trp Ile Pro Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val CDR1]

 ATGACTCAGGTGCACCCCTCTGTACCTCTGGAGAGTCAGTAACCATCTCCATGGAGTC TAGTAAAGAGTCCTCTGCA TAGTAAAT 450
 Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn CDR2

 GGCACACCTTACTTGTATIGGTTCTACAGAGGCCAGGCCAGCTCCCTAGCTCTGATAATACGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTC 540
 Gly Asp Thr Tyr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val CDR3

 CCAGACAGGTTCAAGGGCAGTGGCTAGGAACACTGCTTCAACTTGAGATCAGTAGAGTGAGGGCTGAGATGGGTGTTTATACGTG 630
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys CDR4

 ATGACAGATCTAGATAATCCGCTCACGTTGGGAGCTGAAAGCTGGAGCTGAAAGGGCTGATGCGCAGCAACTGATCCATCICIG 720
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Pro Thr Val Ser Ile puC18

 GGTACCGAGCTCGAATTCTGTAATCATGTCAAGCTGTTCTGTGAAATTG 773

Subgrupo II de cadena ligera kappa de ST2146-D3d-F6e

Figura 11: secuencia de cDNA variable de cadena pesada de ST2146 y secuencia de aminoácidos deducida

oligo de VH1 antisentido

[AGG TGA ACT TGCA GGAG CT GG] CCT GAG CT GG TGAA AG CCT CAG TGAA AG GT AT CC TGCA AGG CCT TC TGG TT AT GCAT TT CAC TA 90
Lys Val Lys Leu Gin Gin Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Ser Gly Ala Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr []
CDR1

GCT ACA AAC AT GTG TAC CT GGG TGAA GG CAG AGC CAT GGAA AG AGC CT TGAG TG GATT GG AT AT ATT GAT CCT TACA A TGG TT TACT AGCT ACA 180
Ser Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Glu Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly [Tyr Ile Asp Pro] Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr []
CDR2

ACC AGA AG TT CA AG GG G G [DA AGGC AC ATT GACT G TT GAC AAG ITC CCT CAG GCAC AGC CCT AC AT GC AT CT AAC AG CCT GAG GACT 270
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
[]
CDR3

C TG CAG TCT ATT ACT GTG CA AG A GGGGG CGG TAG TAT T CACT A TG CT A TG GACT A 359
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Ile Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser []
oligo VH1 en sentido correcto

Subgrupo II A de la cadena pesada gamma de ST2146