



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 977**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)	C07K 2/00 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)	C07K 5/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)	C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 17/00 (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01)	C07H 5/04 (2006.01)
C07H 5/06 (2006.01)	C12N 15/57 (2006.01)
C12P 7/66 (2006.01)	

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02726672 .5**

(96) Fecha de presentación : **15.03.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1411962**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

(54) Título: **Terapia con anticuerpos monoclonales para el cáncer de páncreas.**

(30) Prioridad: **15.03.2001 US 276284 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2011

(73) Titular/es: **NEOGENIX ONCOLOGY, Inc.**
445 Northern Boulevard
Great Neck, New York 11021, US

(72) Inventor/es: **Arlen, Myron y**
Tsang, Kwong, Y.

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Terapia con anticuerpos monoclonales para el cáncer de páncreas .

1. INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere al uso del anticuerpo monoclonal 31.1 y sus equivalentes y anticuerpos coespecíficos en el tratamiento y el diagnóstico del cáncer de páncreas. Se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el anticuerpo monoclonal 31.1 es reactivo con células de páncreas malignas, pero no con las no malignas. La presente memoria descriptiva da a conocer además secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que comprenden la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de Mu-31.1 tal como se expone en la figura 2 y la figura 4, respectivamente. Tales secuencias de polinucleótidos pueden usarse para expresar de manera recombinante anticuerpos equivalentes a 31.1 para su uso en los procedimientos de la invención.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

2.1. CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas es la quinta causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos, esperándose que este año mueran aproximadamente 28.000 estadounidenses por la enfermedad (sitio web sobre el cáncer de páncreas, The Johns Hopkins Medical Institutions, http://162.129.03.69:80/PANCREAS_INTRO). En la actualidad, el único tratamiento potencialmente curativo es la extracción quirúrgica del cáncer, en el contexto de un procedimiento extenso y complejo que extrae la cabeza, el cuello y el proceso unciforme del páncreas así como la mayor parte del duodeno (la "operación Whipple"). Sin el tratamiento, la tasa supervivencia global a 5 años es sólo del 3 por ciento (*Id.*).

La quimioterapia (que usa a menudo gemcitabina (Gemzar®)) y terapia con radiación son los tratamientos principales ofrecidos a los pacientes con tumores no reseccionables (*Id.*). Actualmente está estudiándose una inmunoterapia experimental en la que se modifican genéticamente las propias células de un paciente para expresar la proteína inmunoestimuladora, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, se irradian para evitar el crecimiento tumoral, y entonces se introducen de nuevo al paciente, en el que se espera que éstas estimulen una respuesta inmunitaria (1997, Cancer Res. 57:1537-1546; sitio web sobre el cáncer de páncreas, The Johns Hopkins Medical Institutions, http://162.129.103.69:80/PANCREAS_MEDICAL_TX)).

2.2. ANTICUERPO MONOCLONAL 31.1

El anticuerpo 31.1 representa un anticuerpo monoclonal dirigido a proteínas derivado mediante la inmunización de ratones BALB(c) con una preparación de membrana obtenida de muestras de carcinoma de colon alogénicas (humanas) combinadas. Se fragmentaron las células usadas para preparar el antígeno usando una bomba de nitrógeno (Parr) y entonces se sometieron a ultracentrifugación. Inicialmente se sometió a prueba el material de membrana mediante microscopía electrónica para garantizar la compatibilidad entre lotes, descartando los componentes citoplasmáticos y nucleares. Después, se sonicó y fraccionó con Sephadex G200. Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida discontinua para la purificación parcial inicial (aproximadamente el 80%) y se sometieron a prueba 30 µg para detectar hipersensibilidad cutánea retrasada (DHR), (3). Se inmunizaron los ratones BALB mediante inyección intraperitoneal de 50 microgramos de antígeno asociado a carcinoma de colon. Se proporcionó una segunda inyección 10 días después y luego se sacrificaron los ratones para obtener células del bazo para la fusión. Se realizó la fusión incubando 5×10^7 células de bazo de ratón con 10^7 células de mieloma sp2/0-AG 14 en PEG al 40%. Se ha demostrado que el antígeno definido por el anticuerpo monoclonal 31.1 tiene un PM de 72.000. Estudios que usan la inmunoperoxidasa han sugerido que se observa con mayor frecuencia el antígeno reconocido por 31.1 en los tumores de colon de grado superior. La especificidad para el anticuerpo es alta de modo que en un estudio de colonocitos eliminados en la clínica Mayo, la sensibilidad y especificidad fueron superiores cuando se compararon con anticuerpos anti-CEA, anti-MUC1 y B72.3.

Se aislaron varios anticuerpos candidatos y se sometieron a prueba a partir de la primera generación de TAA. Todos demostraron ser derivados proteicos y relativamente específicos para el carcinoma de colon. El anticuerpo 31.1 correspondió a uno de dos antígenos que se ha demostrado que migran estrechamente en la electroforesis en gel y se relacionan con la glicoproteína inmunogénica que induce DHR. La versión murina es de isotipo IgG2a que se convierte a un isotipo IgG1 en la quimerización. Se encontró que 31.1 tiene fuertes índices de localización. Como tal, este anticuerpo fue el primero que se quimerizó.

Para la quimerización del anticuerpo monoclonal 31.1, se sometió a corte y empalme el exón que codifica para la proteína del gen de región variable de cadena pesada de 31.1 con los exones que codifican para proteína de la región constante de cadena gamma 1 humana. Se empleó PCR. Se amplificó el ADNc de VH de 31.1 mediante la PCR usando los cebadores inversos degenerados sintetizados basándose en las secuencias de ADN de la primera región de entramado (FR1) consenso y un cebador directo sintetizado según las secuencias de ADN de la región de unión J-C consenso. Se clonó el ADN de VH de 31.1 amplificado en el vector pBluescript y se secuenció. Se produjo 31.1 quimérico transfectando células SP2/0AG14 con el vector.

El anticuerpo monoclonal 31.1 y una versión quimérica (humanizada) de ese anticuerpo se describen en la patente estadounidense n.º 5.688.657 expedida el 18 de noviembre de 1997, en la actualidad objeto de una solicitud

de reexpedición. Además, el anticuerpo monoclonal 31.1 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"), que tiene una dirección en 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209 y se le asignó el número de registro ATCC PTA-2497 y se ha depositado la versión quimerizada en la ATCC y se le asignó el número de registro 12316.

5 3. SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se refiere al uso de equivalentes de unión del anticuerpo monoclonal 31.1, incluyendo versiones quimerizadas y/o humanizadas de los mismos, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos que se unen de manera competitiva y fragmentos de anticuerpos, así como anticuerpos, derivados y fragmentos coespecíficos en el tratamiento y diagnóstico del cáncer de páncreas.

10 Se basa, al menos en parte, en estudios *in vitro* usando tanto versiones murinas como quiméricas de 31.1 que compararon las actividades ADCC de los anticuerpos 31.1 con D6-12 y 17.1a (Panorex). Mientras que la versión murina de 31.1 puede inducir una de respuesta de ADCC del 35%, se ha mostrado que la versión quimérica da como resultado la destrucción del 80% de células tumorales cada tres horas, usando un ensayo de liberación de cromógeno. Esto se compara con la tasa del 30% de destrucción asociada con D6-12 y una tasa del 15% para Panorex.

15 Usando modelos de xenoinjerto con líneas celulares de cáncer de colon humanas LC-174T y Colo205, se encontró que 31.1 quimérico provocaba la regresión de líneas tumorales establecidas (moléculas bien definidas) tras inocular dos millones de células tumorales en las patas traseras de ratones desnudos y administrar anticuerpo intraperitoneal a los 10 días junto con células efectoras humanas. A los 30 días, el volumen del tumor en los animales tratados en comparación con los controles se redujo en más del 95%. Pueden esperarse resultados similares cuando se dirige el anticuerpo hacia células cancerosas de páncreas, ya que se ha demostrado que el anticuerpo 31.1 se une al antígeno presente en células cancerosas de páncreas, pero no a tejidos de páncreas no malignos.

La presente memoria da a conocer secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que comprenden la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de Mu-31.1 que pueden usarse para expresar anticuerpos 31.1 quimerizados. Estas secuencias de nucleótidos incluyen: (a) las secuencias de nucleótidos mostradas en la figura 2 o la figura 4; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 o la figura 4; y (c) cualquier secuencia de nucleótidos que (i) se une a la secuencia de nucleótidos de la figura 2 o la figura 4 en condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo, hibridación a ADN unido a filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0,1% a 68° y (ii) codifica para una región variable de cadena ligera y pesada que puede unirse con la misma inmunoespecificidad que el anticuerpo monoclonal 31.1 quimérico.

La memoria da a conocer además un nuevo constructo de expresión de anticuerpo 31.1 quimerizado, denominado pRc/CMV 31.1 que se ha depositado en la ATCC y se le ha asignado el n.º de registro de ATCC []. Este plásmido lleva una unidad de expresión de dihidrofolato reductasa ("*dhfr*") activada mediante un promotor precoz de SV40 que carece de promotor que permite la expresión a más de 200 mg/litro en células de ovario de hámster chino que carecen de dihidrofolato reductasa.

35 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-F. Serie de plásmidos usados para construir el vector pRc/CMV 31.1 insertando los genes de cadena ligera y de cadena pesada de Chi31.1-1 en el plásmido pDCM-dhfr (figura 1F).

40 Figura 2. Secuencia de ácido nucleico (bicatenario) y secuencias de aminoácidos posibles (dependiendo del marco de lectura) de la región variable de cadena ligera de 31.1, que muestran los sitios de escisión de enzimas de restricción.

Figura 3. Lista de enzimas que no cortan de la secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena ligera mostrada en la figura 2.

45 Figura 4. Secuencia de ácido nucleico (bicatenario) y secuencias de aminoácidos posibles (dependiendo del marco de lectura) de la región variable de cadena pesada de 31.1, que muestran los sitios de escisión de enzimas de restricción.

Figura 5. Lista de enzimas que no cortan de la secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena pesada mostrada en la figura 4.

50 Figuras 6A-B. Se realizó un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para someter a prueba la función efectora del anticuerpo chi 31.1 de CHO contra células diana SW 1643 y PANC-1. Puesto que se produce lisis celular en presencia de anticuerpo 31.1 (figura 6A) pero no en presencia de anticuerpo de control (figura 6B).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para fines de claridad de la presentación y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las dos subsecciones siguientes:

- i) anticuerpo monoclonal 31.1 y sus equivalentes; y
- ii) protocolo de tratamiento.

5.1. ANTICUERPO MONOCLONAL 31.1 Y SUS EQUIVALENTES

El anticuerpo monoclonal 31.1 es un anticuerpo monoclonal murino (denominado a continuación en el presente documento Mu-31.1), originariamente generado mediante inmunización con material purificado a partir de membranas celulares de carcinoma de colon. Las células del hibridoma que secretan este anticuerpo se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") y se les asignó el n.º de registro de ATCC PTA 2497.

La presente memoria descriptiva da a conocer moléculas de ácido nucleico y polipéptidos que comprenden la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de Mu31.1. Las secuencias de nucleótidos incluyen; (a) las secuencias de ADN mostradas en la figura 2 o la figura 4; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 o la figura 4; (c) cualquier secuencia de nucleótidos que (i) se hibrida con la secuencia de nucleótidos expuesta en (a) o (b) en condiciones rigurosas, por ejemplo, hibridación a ADN unido a filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel F. M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & sons, Inc., Nueva York, en p.2.10.3) y (ii) codifica para un producto génico funcionalmente equivalente. Los productos génicos funcionalmente equivalentes incluyen aquellos polipéptidos que compiten con 31.1 para unirse a su antígeno diana. La descripción también abarca secuencias de nucleótidos que codifican para fragmentos de péptidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera, y proteínas de fusión de las mismas.

Los nucleótidos pueden aislarse usando una variedad de diferentes procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede examinarse una biblioteca de ADNc construida usando ARN de células o tejido que se sabe que expresan el anticuerpo monoclonal 31.1 o su equivalente, usando una sonda de ácido nucleico marcada derivada de las secuencias representadas en la figura 2 o la figura 4. Además, pueden derivarse secuencias de ácidos nucleicos que codifican para las regiones variables de cadena pesada y ligera realizando PCR que usa dos cebadores oligonucleotídicos diseñados basándose en las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en el presente documento. El molde para la reacción puede ser ADNc obtenido mediante transcripción inversa de ARNm preparado a partir de líneas celulares o tejido que se sabe que expresan el anticuerpo monoclonal 31.1.

La descripción también abarca (a) vectores de ADN que contienen cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera anteriores y/o sus complementos (es decir, antisentido); (b) vectores de expresión de ADN que contienen cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera anteriores asociada operativamente a un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificantes de la región variable de cadena pesada y ligera; y (c) células huésped genéticamente modificadas por ingeniería que contienen cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera anteriores asociada operativamente a un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificantes en la célula huésped. Tal como se usa en el presente documento, los elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos que los expertos en la técnica saben que activan y regulan la expresión.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de cadena ligera de 31.1 y la figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de cadena pesada de 31.1. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de la invención incluyen la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 y la figura 4.

La descripción también abarca proteínas que son funcionalmente equivalente a proteínas codificadas por las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, tal como se evalúa mediante cualquiera de varios criterios, incluyendo, pero sin limitarse a, la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 31.1.

Los péptidos que corresponden a uno o más dominios de las regiones variables de cadena pesada y ligera, así como las proteínas de fusión en las que se fusiona la longitud completa o una parte de la región variable de cadena pesada y ligera con una proteína no relacionada, también están dentro del alcance de la invención y pueden diseñarse basándose en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos dadas a conocer en el presente documento (véanse la figura 2 y la figura 4).

Mientras que las regiones variables de cadena pesada y ligera pueden sintetizarse químicamente (por ejemplo, véase Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y.), las regiones pueden producirse ventajosamente mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica para expresar un ácido nucleico que contiene secuencias génicas y/o secuencias

codificantes de región variable de cadena pesada y ligera. Tales procedimientos pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1989, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, 1989, citado anteriormente).

Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar las secuencias de nucleótidos. Cuando se expresan las regiones variables de cadena pesada y ligera como un derivado soluble y no se secretan, puede recuperarse el péptido o polipéptido de la célula huésped. Alternativamente, cuando se secretan las regiones variables de cadena pesada y ligera, pueden recuperarse el péptido o los polipéptidos de los medios de cultivo.

Los sistemas de expresión que pueden usarse para fines de la invención incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o de cósmido que contienen secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena pesada y ligera de 31.1; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables de cadena pesada y ligera de 31.1 o sistemas de células de mamíferos que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos o de virus de mamíferos.

Pueden elegirse sistemas de expresión apropiados para asegurar que se produzca la correcta modificación, procesamiento y ubicación subcelular de la proteína de región variable de cadena pesada y ligera. Para este fin, se prefieren células huésped que poseen la capacidad de modificar y procesar apropiadamente anticuerpos para su secreción. Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes, tal como la deseada para el desarrollo de líneas celulares para la producción de anticuerpos quiméricos, se prefiere la expresión estable. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación, pueden transformarse las células huésped con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados y un gen marcador seleccionable, es decir, gen *tk*, *hgprrt*, *dhfr*, *neo* e *hygro*, por mencionar unos pocos. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse que las células modificadas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en medios enriquecidos, y entonces se cambian a un medio selectivo.

Una versión quimérica de 31.1 murino, denominada a continuación en el presente documento Chi-31.1-1, que comprende la región variable de Mu-31.1 junto con secuencias de inmunoglobulina de región constante humanas, se produce mediante células de hibridoma depositadas en la ATCC y a las que se les asigna el n.º de registro de ATCC CRL-12316.

En una realización específica de la invención, puede producirse una segunda versión quimérica de 31.1 murino, denominada a continuación en el presente documento Chi-31.1-2, que tiene regiones variables de Mu-31.1 y regiones de inmunoglobulina constantes humanas y derivadas de los genes de cadena pesada y ligera de Chi31.1-1, mediante expresión del vector pRc/CMV 31.1, descrito en el presente documento, y tal como se muestra en la figura 1. Este vector tiene la ventaja de producir altos rendimientos de anticuerpo quimérico. Una descripción de la preparación de este vector se proporciona en la sección de ejemplos, a continuación.

En realizaciones no limitativas específicas de la invención, pueden producirse versiones quiméricas adicionales que comprenden las regiones variables de Mu-31.1. Por ejemplo, pueden generarse la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera usando cebadores de PCR diseñados basándose en las secuencias de región variable expuestas en la figura 2 (región variable de cadena ligera) y la figura 4 (región variable de cadena pesada) o variantes de las mismas para alterar los extremos terminales para facilitar el corte y empalme en un vector de elección y usar, como fuente de ADN molde, ADN recogido de un hibridoma que produce un equivalente de Ac 31.1, tal como uno de los hibridomas expuestos anteriormente que se han depositado en la ATCC. Entonces pueden combinarse las secuencias que codifican para regiones variables con secuencias que codifican para regiones constantes humanas para producir un anticuerpo "humanizado".

Alternativamente, el ácido nucleico que codifica para las cadenas pesada y ligera de Chi31.1-1 (incluyendo las regiones constantes humanas) puede insertarse en diversos vectores de expresión para facilitar la expresión. Ejemplos no limitativos específicos de tales cebadores de PCR son:

a) para la inserción de secuencias que codifican para la cadena ligera de Chi31.1-1 en un sitio de inserción BamHI/XbaI:

i) Chi31.1-LcBamHI (S):

5'-ATA GGA TCC ATG AAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC G-3'

ii) Chi31.1-LcXbaI (A):

5'-TTT CTA GAC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG C-3'

b) para la inserción de secuencias que codifican para la cadena pesada de Chi31.1-1 en un sitio de inserción EcoRI/NotI:

i) Chi31.1-HcEcoRI (S):

5'-ATA GAA TTC ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CT-3'

ii) Chi31.1-HcNotI (A):

5'-TTG CGG CCG CTC ATT TAC CCG GAG-3'.

5 Tales cebadores pueden usarse en reacciones en cadena de la polimerasa usando, como molde, ADN preparado de células de hibridoma depositadas en la ATCC y a las que se les asigna el n.º de registro de ATCC CRL-12316.

10 En el presente documento se definen "equivalentes" de Mu-31.1 como moléculas o fragmentos de inmunoglobulina o derivados de los mismos que compiten con Mu-31.1 para la unión a su antígeno diana, tal como se evalúa usando técnicas convencionales. Tales equivalentes pueden incluir moléculas de anticuerpo completas (es decir, que tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), moléculas de anticuerpo de una única cadena (véase, por ejemplo, Lee *et al.*, 1999, *Molec. Immunol.* 36: 61-71), fragmentos tales como fragmentos F(ab) y F(ab)₂ de Mu-31.1, Chi-31.1-1, Chi-31.1-2, o moléculas de anticuerpos completos equivalentes, y moléculas derivadas incluyendo, pero sin limitarse a, una o más de las moléculas de inmunoglobulina anteriores o fragmentos conjugados a un agente bioactivo, o modificadas para asemejarse más estrechamente a una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo; Ryu *et al.*, 1996, *Human Antibod. Hybridomas* 7:113-122). Tales equivalentes, que incluyen Mu-31.1, Chi-31.1-1, Chi-31.1-2, se denominan de manera colectiva "equivalentes de Ac 31.1".

20 Según la invención, también se prevé el uso de anticuerpos coespecíficos y sus equivalentes (teniendo los equivalentes el mismo alcance que el aplicado al anticuerpo 31.1). Un anticuerpo coespecífico frente a Mu-31.1 (denominado "anticuerpos coespecíficos para 31.1") puede, o alternativamente puede no, competir con la unión de Mu-31.1, pero reconoce (es decir, se une a) el mismo antígeno diana, denominado en el presente documento "Ag 31.1". Los anticuerpos coespecíficos para 31.1 y sus equivalentes se denominan en el presente documento "equivalentes de anticuerpos coespecíficos para 31.1".

25 Cualquier equivalente de 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 que va a usarse en seres humanos tiene preferiblemente una estructura que por sí misma no provoca una reacción inmunitaria perjudicial en seres humanos. Por ejemplo, dicho equivalente de anticuerpo de 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 puede carecer inherentemente de tales estructuras inmunogénicas o pueden ser el producto de un proceso de "humanización" mediante técnicas convencionales que minimizan o eliminan estructuras que se reconocerían como no propias por un sujeto (por ejemplo, la quimerización y/o la modificación mediante ingeniería sitio por sitio). El Ag 31.1 parece que se ubica en la membrana de cánceres de colon y de páncreas. Su presencia aún no se ha detectado en tejido humano normal recién obtenido e inmediatamente congelado (tabla A).

TABLA A. Reactividad cruzada frente a tejidos humanos recién congelados normales.

Tejido (número)	Tinción con parafina	Tinción de muestras congeladas
Colon (3)	Negativo (3)	Negativo (2) Traza positiva (1)
Intestino delgado (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Esófago (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Mucosa oral (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Yeyuno (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Estómago (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Hígado (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Páncreas (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Timo (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Corazón (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Próstata (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Mama (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Testículo (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Ovario (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Glándulas salivales (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Bazo (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Cerebro (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Ganglios linfáticos (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Glándula suprarrenal (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Vagina (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Leucocitos (1)	Negativo (1)	Negativo (1)

Sin embargo, Ag 31.1 se encuentra en la superficie de cánceres de colon y páncreas recién obtenidos en el momento de la cirugía y congelamiento (tabla B).

TABLA B. Ubicación de antígeno 31.1 en cánceres de colon y páncreas

Cáncer (número)	Tinción con parafina	Tinción de muestras congeladas
Adenocarcinoma de colon (3)	Positivo (3)	Positivo (3)
Adenocarcinoma de páncreas (3)	Positivo (3)	Positivo (3)

5

Debe observarse que estos resultados difieren de los presentados en la tabla 2 de la patente estadounidense n.º 5.688.657 (en la columna 24, líneas 1-26), que indican que el anticuerpo Mu-31.1 no se unió a ninguna de dos muestras de tumores de páncreas sometidas a prueba. La tabla 1 de la patente estadounidense n.º 5.688.657 (en la columna 23, líneas 1-38) muestra que Mu-31.1 reaccionó con dos de tres líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas. Basándose en la información contenida en la patente estadounidense n.º 5.688.657, puede concluirse que Ag 31.1 sólo apareció tras el pase de las células en cultivo, y no estaba presente en el tejido de cáncer de páncreas reciente. Por tanto, no se espera, basándose en la descripción de la patente estadounidense n.º 5.688.657, que el Ag 31.1 estuviera presente en 3/3 muestras de tumor de páncreas, tal como se expone en la tabla B en el presente documento.

10

15

Mu-31.1 se secreta a partir de una línea celular de hibridoma desarrollada mediante fusión con la línea celular SP2 murina. Mu-31.1, Chi-31.1-1 y Chi-31.1-2, equivalentes de Ac 31.1, y anticuerpos coespecíficos para 31.1 pueden prepararse, por ejemplo y no a modo de limitación, para su uso clínico mediante cultivo celular *in vitro*

convencional y procedimientos de purificación aguas abajo. Por ejemplo, pueden hacerse crecer células de hibridoma en genética (0,2 mg/ml) dado que se ha observado que la presencia del antibiótico permite que las células de hibridoma crezcan mejor.

5 Preferiblemente, las composiciones que comprenden los equivalentes de Ac 31.1 y anticuerpos coespecíficos para 31.1 anteriores pueden prepararse sin la adición de aditivos humanos. Por ejemplo, las preparaciones pueden filtrarse a través de un filtro de 0,2 micras Millipore para bacterias para eliminar contaminantes y verificarse que son estériles para bacterias y hongos cultivando en líneas controles positivos en placas de agar sangre y medios de cultivo durante 14 días. Puede determinarse que la preparación está libre de micoplasma mediante, por ejemplo, ensayos de PCR para micoplasma y mediante placas de agar para micoplasma (Life Technology n.º de cat. 18042-010) y kit Myco Test (Life Technology n.º de cat. 15672-017) usando células de control 3T6.

10 Los medios que contienen uno o más de los equivalentes de Ac 31-1 o anticuerpos coespecíficos para 31.1 anteriores pueden filtrarse a través de un filtro para endotoxina Pall y se esteriliza por calor el material de vidrio para eliminar endotoxinas. De manera deseable, pero no a modo de limitación, un nivel de endotoxina apropiado puede ser de 0,125 unidades/ml o menos, tal como se mide mediante el kit de prueba BioWhittaker Pyrogen 03,250.

En realizaciones no limitativas, preferidas de la invención, puede tratarse una de las preparaciones anteriores de modo que inactiven virus. Por ejemplo, puede inactivarse retrovirus mediante el tratamiento con ácido acético a pH 3 durante una hora durante una cromatografía en columna y filtración a través de un filtro de eliminación de virus DV50 de calidad Pall Ultipor de 10-40 nm.

20 En una realización no limitativa, específica de la invención, se contienen 50 mg de Chi31.1-1 en un vial a una concentración de 2 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato ("PBS").

5.2. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

La presente invención proporciona el uso de equivalentes de Ac 31.1 y/o equivalentes de anticuerpos coespecíficos para 31.1, que se usan individualmente o en combinación, en el tratamiento del cáncer de páncreas en un sujeto en necesidad de tal tratamiento. El procedimiento implica administrar, al sujeto, una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más equivalentes de Ac 31.1 y/o equivalentes de anticuerpos coespecíficos para 31.1. En el presente documento, se define una dosis terapéuticamente eficaz como una dosis que logra uno o más de lo siguiente en el sujeto: produce lisis de células de carcinoma de páncreas detectable en el sujeto; provoca una disminución del crecimiento, o capacidad de invasión, o tamaño de un tumor de páncreas; provoca una mejora de los síntomas clínicos; y/o provoca un aumento en el tiempo de supervivencia. Preferiblemente, pero no a modo de limitación, una dosis individual de equivalente de Ac 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 puede oscilar desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 1000 mg, y preferiblemente desde aproximadamente 100 mg hasta 250 mg. La magnitud de la dosis puede ajustarse basándose en cada paciente para evitar efectos secundarios no deseados y/o toxicidad. Se prefiere que se administre el equivalente de Ac 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 como una serie (pluralidad) de dosis individuales, administradas a intervalos de entre aproximadamente 1 y 4 semanas, preferiblemente cada dos semanas, hasta que los efectos secundarios se eleven hasta un nivel no deseable o la enfermedad evolucione hasta un nivel no deseable. El equivalente de Ac 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 pueden administrarse mediante cualquier vía convencional; preferiblemente, para someter a prueba si un paciente tolera la formulación (es decir, el paciente no manifiesta una reacción alérgica y/u otra reacción tóxica no deseable), en primer lugar puede administrarse por vía subcutánea, y una vez que se muestra su tolerancia adecuada, puede administrarse por vía intravenosa.

En un ejemplo no limitativo, específico, un protocolo según la invención puede ser tal como sigue.

45 Usando procedimientos asépticos, puede filtrarse un equivalente de Ac 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 "humanizado", producido usando técnicas de biotecnología convencionales, a través de un filtro de proteínas de bajo peso molecular de 0,22 micras en una botella de infusión de vidrio o una bolsa de infusión que no contiene DEHP que contienen cloruro de sodio al 0,9% hasta una concentración final de 0,4 mg/ml. Puede mezclarse suavemente lo infundido. Si se observa que la infusión está turbia, ésta no debe administrarse.

50 Para determinar si un paciente tolera el tratamiento con el equivalente de Ac 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.2 "humanizado", puede medicarse previamente al paciente con difenhidramina 25 mg i.v. y paracetamol 650 mg v.o., y entonces pueden inyectarse por vía subcutánea 30 microgramos de equivalente de Ac 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1. Si no se produce toxicidad alérgica o se produce una toxicidad alérgica de grado 1, se realizará el tratamiento intravenoso. Si se produce una toxicidad alérgica de grado 1, será necesaria la resolución de la toxicidad antes de continuar con la inyección intravenosa.

55 Si el paciente tolera la dosis de prueba subcutánea descrita en el párrafo anterior, el paciente puede tratarse con una primera infusión de 25 mg del equivalente de Ac 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 durante 2 horas. Puede proporcionarse medicación previa en forma de difenhidramina 25 mg i.v. y paracetamol 650 mg v.o. Entonces, puede observarse al paciente para detectar cualquier posible efecto secundario durante 6 horas tras la inyección. Pueden monitorizarse los signos vitales del paciente antes de la inyección, y cada 15

minutos durante la primera hora de tratamiento, cada 30 minutos durante dos horas después de eso, y cada hora después de eso hasta 6 horas tras la finalización de la infusión.

Si se encuentra que se tolera la primera infusión, tras 2 semanas, entonces el paciente puede recibir una infusión de 50 mg del equivalente de Ac 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1, en un volumen de 100 cc de PBS u otro diluyente adecuado, durante 4 horas usando el mismo protocolo clínico tal como se expone en el párrafo anterior. Si también se encuentra que se tolera esta segunda infusión, entonces el paciente puede recibir infusiones de 100 mg del equivalente de Ac 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 en 100 cc de diluyente durante 4 horas cada dos semanas, usando el protocolo descrito anteriormente. Entonces el paciente puede continuar tal tratamiento hasta que se desarrolle intolerancia o se produzca evolución de la enfermedad, y preferiblemente durante un máximo de 4 meses. Si se produce alguna toxicidad de grado 3 o superior debido al tratamiento, el paciente puede interrumpir el tratamiento de manera permanente. Si se considera que la toxicidad no está relacionada con el tratamiento, el paciente puede reanudar el tratamiento tras la recuperación de la toxicidad. Si se produce alguna toxicidad de grado 2 durante o tras el tratamiento, la infusión puede detenerse de manera deseable. Si se produce recuperación hasta grado 0, entonces puede reanudarse la infusión. Si no se ha producido la recuperación en el momento del siguiente tratamiento planeado, puede retrasarse el tratamiento hasta que se haya producido recuperación hasta grado 0. Si no se produce la recuperación hasta grado 0 en el plazo de 4 semanas, el tratamiento puede interrumpirse de manera permanente. Si se produce alguna reacción alérgica de grado 2 o superior, puede detenerse el tratamiento y preferiblemente no puede proporcionarse ninguna infusión adicional.

En realizaciones no limitativas, específicas de la invención, lo siguiente puede servir como criterios para seleccionar pacientes adecuados para el tratamiento:

a) el paciente puede padecer un adenocarcinoma del páncreas recurrente o metastásico confirmado de manera histológica, en el que el tumor reacciona con el equivalente de Ac 31.1 o anticuerpo coespecífico para 31.1 que se pretende usar;

b) puede haber fracasado el tratamiento del paciente mediante un régimen convencional para cáncer de páncreas metastásico;

c) la enfermedad en el paciente puede ser medible por uno o más de los siguientes:

i) exploración física;

ii) tomografía computerizada u otro estudio radiológico;

iii) niveles de CEA; y/o

iv) niveles de Ca 19-9;

d) el paciente puede tener 18 años o más;

e) el paciente puede presentar un estado general según la OMS de 0, 1 ó 2;

f) el pronóstico del paciente puede indicar una esperanza de vida de al menos 12 semanas;

g) las pruebas hematológicas del paciente pueden indicar los siguientes valores:

i) leucocitos > 3.000;

ii) hemoglobina (HGB) > 10; y

iii) plaquetas > 100.000;

h) los valores de química clínica pueden ser tal como sigue:

creatinina, bilirrubina, aspartato transaminasa, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina son todos inferiores o iguales a 2 veces el límite superior de lo normal; y/o

i) el paciente tiene acceso venoso periférico adecuado para la toma de muestras de sangre repetida.

En realizaciones no limitativas específicas de la invención, lo siguiente puede servir como criterios para excluir a pacientes que pueden ser inadecuados para el tratamiento:

a) pueden haber transcurrido menos de 4 semanas desde la quimioterapia anterior (o 6 semanas para nitrosoureas o mitomicina C), desde el tratamiento con modificadores de la respuesta biológica o desde la radioterapia;

b) actualmente el paciente recibe terapia con esteroides

c) la paciente está embarazada (se aconseja a los hombres y las mujeres en el estudio, si son fértiles, que practiquen anticoncepción eficaz);

d) el paciente es una mujer en periodo de lactancia;

e) el paciente padece un estado comórbido no maligno debilitante, tal como infección activa o una complicación intercurrente aguda de cáncer;

f) existe una implicación del sistema nervioso central;

5 g) el paciente ha recibido previamente un trasplante de médula ósea u otro órgano;

h) el paciente tiene una historia de otro cáncer, excepto cáncer de la piel distinto de melanoma tratado adecuadamente o cáncer de cuello uterino *in situ*;

i) se ha expuesto previamente al paciente a anticuerpos monoclonales o policlonales murinos; y/o

j) se sabe que el paciente es positivo para el VIH.

10 Durante el transcurso del estudio, ejemplos no limitativos de reacciones adversas incluyen disnea, hipotensión, cianosis, exantema, broncoespasmo, escalofríos, rigidez, dolor de espalda, fiebre, cianosis, náuseas, vómitos, palpitaciones o cualquier otra reacción adversa.

15 En realizaciones no limitativas de la invención, pueden realizarse de manera deseable las siguientes pruebas de laboratorio para evaluar a pacientes que van a tratarse mediante el protocolo. Con respecto a las pruebas de hematología, pueden obtenerse un hemograma completo, fórmula leucocitaria y recuento de plaquetas antes de cada infusión y semanalmente durante el tratamiento hasta cuatro semanas tras la última inyección. Con respecto a las pruebas de química clínica, puede obtenerse semanalmente un panel químico completo que mide glucosa, sodio, potasio, bicarbonato, cloruro, nitrógeno ureico, creatinina, ácido úrico, calcio, fosfato inorgánico, proteína total, albúmina, lactato deshidrogenasa, aspartato transaminasa, alanina transaminasa y fosfatasa alcalina durante el tratamiento y hasta cuatro semanas tras la última inyección. Con respecto a pruebas de laboratorio especiales, pueden recogerse muestras de suero obtenidas de 10 cc de sangre antes de y en el plazo de dos minutos tras cada inyección, en tiempos de 15 min., 30 min., 60 min., 2, 4, 24 y 72 horas tras la finalización de la primera inyección y cada dos semanas después de eso antes de cada inyección y hasta cuatro semanas tras el último tratamiento y procesarse para la detección de equivalente de Ac 31-1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 administrado. Entonces pueden usarse estas muestras de suero para determinar ADCC, concentración de anticuerpos y la presencia de anticuerpos humanos dirigidos contra el equivalente de anticuerpo administrado. Puede realizarse un análisis de orina en la inclusión y antes de cada inyección así como cuatro semanas después de la última inyección, realizándose un examen microscópico en cualquier muestra anómala.

30 En diversas realizaciones de la invención, pueden realizarse de manera deseable las siguientes evaluaciones de seguridad. Para cada infusión, pueden obtenerse los signos vitales incluyendo la temperatura, el pulso y la tensión arterial del paciente antes y después de cada infusión. Puede registrarse el pulso y la tensión arterial cada quince minutos durante la primera hora de infusión y luego cada media hora durante dos horas, seguido por cada hora hasta 6 horas tras la finalización de la infusión. Puede observarse a los pacientes y monitorizarse los signos vitales hasta seis horas tras la finalización de la infusión o hasta el regreso al nivel inicial de los signos vitales.

35 Pueden realizarse una evaluación inicial y evaluaciones posteriores de la respuesta del paciente al tratamiento tal como sigue. Puede realizarse la medición del tumor mediante exploración física y/o estudios radiológicos especiales o convencionales tales como radiografía de tórax, tomografía computerizada, obtención de imágenes por resonancia magnética o ecografía. Si existe más de una lesión medible, deben medirse las lesiones representativas. Pueden registrarse las mediciones perpendiculares más largas de las lesiones representativas antes del tratamiento y cada ocho semanas. Pueden monitorizarse regularmente los niveles de Ca 19.9, por ejemplo mensualmente.

Preferiblemente se obtiene el consentimiento informado por escrito para cada paciente que va a tratarse. Debe proporcionársele a cada paciente una descripción verbal del tratamiento, sus riesgos y beneficios potenciales así como tratamientos alternativos disponibles, antes de firmar el consentimiento por escrito.

45 Durante el transcurso del tratamiento, cuando pueden administrarse hemoderivados, antibióticos, antieméticos, analgésicos u otras medicaciones para estados médicos coexistentes estables según sea apropiado.

El tratamiento puede interrumpirse en un paciente si existen evidencias de enfermedad progresiva, si se produce una reacción adversa grave o inesperada, o por otras razones apropiadas desde el punto de vista médico.

50 Además de los usos terapéuticos descritos en el presente documento, los anticuerpos 31.1 y equivalentes funcionales de los mismos pueden usarse para diagnosticar carcinoma de páncreas en un sujeto. Los procedimientos de diagnóstico de la invención se basan en el descubrimiento de que el anticuerpo 31.1 se une selectivamente a un antígeno expresado en células de carcinoma de páncreas pero no en células normales.

55 Según la invención, puede usarse la medición de los niveles de reactividad de anticuerpo monoclonal 31.1 en muestras derivadas de un sujeto para el diagnóstico de enfermedades tales como carcinoma de páncreas. La detección de la reactividad de del anticuerpo monoclonal 31.1 en una muestra de un sujeto puede llevarse a cabo mediante cualquiera de varios procedimientos. Los procedimientos de diagnóstico preferidos pueden implicar, por

ejemplo, inmunoensayos en los que se detecta el antígeno reactivo para 31.1 mediante su interacción con un anticuerpo monoclonal 31.1. Los inmunoensayos útiles en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo que usan técnicas tales como transferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), inmunoensayos de tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por mencionar unos pocos.

Se obtiene una muestra biológica, tal como tejido de páncreas u otro tejido biológico, a partir de un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer particular o riesgo para el cáncer. Se solubilizan alícuotas de tejidos completos, o células, usando uno cualquiera de una variedad de cócteles de solubilización conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede solubilizarse tejido mediante la adición de tampón de lisis que comprende (por litro) urea 8 M, 20 ml de tensioactivo Nonidet P-40, 20 ml de anfolitos (pH 3,5-10), 20 ml de 2-mercaptoetanol, y fluoruro de fenilmetilsulfoniolo (PMSF) 0,2 mM en agua desionizada destilada.

Los inmunoensayos para detectar la expresión del antígeno reactivo para 31.1 comprenden normalmente poner en contacto la muestra biológica, tal como una muestra de tejido derivada de un sujeto, con el anticuerpo monoclonal 31.1 en condiciones tales que puede producirse una reacción de unión antígeno-anticuerpo inmuno-específica, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica mediante el anticuerpo. En un aspecto, puede usarse tal unión de anticuerpo, por ejemplo, para detectar la presencia y aumento de la producción del antígeno reactivo para 31.1, en el que la detección del antígeno es una indicación de un estado de enfermedad.

6. EJEMPLO: PREPARACIÓN DE VECTOR pRc/CMV VECTOR

Se preparó el vector pRc/CMV usando una serie de plásmidos, tal como se representa en la figura 1A-F. Se clonaron las cadenas pesada y ligera de Chi 31.1-1 en el vector pCR (figura 1A) mediante clonación con TOPO (topoisomerasa 1). Las secuencias usadas para insertar las secuencias de cadena pesada y ligera en el vector pCR mediante PCR son tal como sigue:

a) para la inserción de la región que codifica para cadena ligera de Chi31.1-1 en un sitio de inserción BamHI/XbaI:

i) Chi31.1-LcBamHI (S):

5'-ATA GGA TCC ATG AAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC G-3'

ii) Chi31.1-LcXbaI (A):

5'-TTT CTA GAC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG C-3'

b) para la inserción de la región que codifica para cadena pesada de Chi31.1-1 en un sitio de inserción EcoRI/NotI:

i) Chi31.1-HcEcoRI (S):

5'-ATA GAA TTC ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CT-3'

ii) Chi31.1-HcNotI (A):

5'-TTG CGG CCG CTC ATT TAC CCG GAG-3'

Entonces, estos se clonaron del vector pCR en el vector pDCM-dhfr, de tal manera que se insertó la región que codifica para la cadena ligera en el sitio BamHI/XbaI (bajo el control del promotor de citomegalovirus ("CMV")), y se insertó la región que codifica para la cadena pesada en el sitio EcoRI/NotI, bajo el control de un segundo elemento promotor de CMV (figura 1F).

Se preparó el vector pDCM-dhfr usando la serie de etapas expuesta en las figuras 1B-E. Una serie de construcciones de vector usando algunos componentes relacionados se describe en Ryu *et al.*, 1996, Hum. Antibod. Hybridomas 7:113-122 (basado en el vector pRc/CMV (Invitrogen); véanse, por ejemplo, página 115 y figura 4 de Ryu *et al.*); Jin *et al.*, 1995, Virus Res. 38:269; y Lee *et al.*, 1999, Molec. Immunol. 36:61-71 (véase, por ejemplo, la figura 2 de esta publicación).

Básicamente, se usó el vector pcDNA3 (Invitrogen) (figura 1B) como la base para el vector pDCM (figura 1C), en el que se usó digestión con pares de enzimas de restricción seguido por nuevo ligamiento, en preparaciones paralelas, para destruir determinados sitios de escisión y mantener otros en vectores en sentido de 3' de las secuencias promotoras de CMV. Específicamente, tal como se muestra en la figura 1C, la digestión de pcDNA3 en primer lugar con HindIII y BamHI, seguido por nuevo ligamiento y luego digestión con XhoI y ApaI, seguido por nuevo ligamiento, dio como resultado la conservación de los sitios BstXI, EcoRI, EcoRV, BstXI y NotI en el sentido de 3' del promotor; la posterior escisión con BsmI linealizó la molécula entre los genes de resistencia a ampicilina y neomicina (componente 1). En paralelo, la digestión de pcDNA3 con BstXI y NotI, seguido por la eliminación del fragmento pequeño y nuevo ligamiento, eliminó los sitios BstXI, EcoRI, EcoRV, BstXI y NotI y dejó los sitios HindIII, KpnI, BamHI, XhoI, XbaI y ApaI intactos; la escisión con PvuII y NruI dio lugar a un fragmento que contenía el

promotor CMV, los sitios conservados y BGHpA (componente 2). Se insertó el componente 2 entre los extremos del componente 1, lo que dio como resultado pDCM, que tenía dos sitios de inserción diferentes para los genes en el sentido de 3' de dos elementos promotores de CMV respectivos. Tal como se muestra en la figura 1E, entonces puede insertarse un gen de dihidrofolato reductasa ("*dhfr*") de KC-dhfr en pDCM (véase Lee *et al.*, 1999, Molec. Immunol. 36:61-71) para producir pDCM-dhfr. Alternativamente, tal como se muestra en la figura 1D, puede incorporarse el gen *dhfr* de KC-dhfr en pcDNA3, para producir pCdhfr, que entonces puede modificarse por ingeniería mediante procedimientos análogos a los mostrados en la figura 1C para producir el casete de promotor CMV/sitio de inserción doble.

Entonces, se clonaron las secuencias que codifican para la cadena pesada y ligera de Chi31.1-1 del vector pCR en pDCM-dhfr, formando pRc/CMV, que puede transferirse en las células CHO *dhfr*-, tras de lo cual pueden recogerse moléculas de inmunoglobulina quiméricas expresadas según técnicas convencionales.

7. EJEMPLO: RESPUESTA INMUNITARIA HUMANA A Chi31.1-1

Para determinar si los anticuerpos quiméricos de 31.1 pueden inducir una respuesta inmunitaria, se recogió plasma de un sujeto humano a quien se le había administrado anticuerpo monoclonal quimérico Chi31.1-1. Se sometió a prueba la presencia de una reacción inmunitaria en el paciente frente al anticuerpo quimérico usando el siguiente ensayo.

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con anticuerpo Chi31.1-1, usando una disolución que tenía 10 microgramos por mililitro, con 100 microlitros por pocillo. Se biotiniló una preparación de Chi31.1-1. Entonces, se introdujo o bien el plasma de control o bien el plasma del paciente (50 microlitros) en los pocillos, y se añadieron 50 microlitros del Chi31.1-1 biotinilado. Entonces, se incubaron las placas durante noventa minutos a 37 grados centígrados y luego se lavaron los pocillos y se añadió conjugado de estreptavidina-peroxidasa del rábano. Entonces, se lavaron tres veces los pocillos. Luego, se añadió sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina), y se incubaron las placas durante 20 minutos. Se añadió disolución de parada y se determinó la cantidad del sustrato que reaccionó.

Los resultados se presentan en la tabla C, y se expresan en nanogramos de Chi31.1-1 unidos por mililitro de plasma. Se consideran positivos los resultados mayores de 2 veces por encima del nivel inicial previo al tratamiento. Se encontró que los valores de unión de nivel inicial de 3 muestras normales sanas eran de 4 más o menos 2 nanogramos por mililitro. Se determinó el patrón usando pocillos recubiertos con anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana con diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal Chi31.1-1 biotinilado.

30 TABLA C.

Respuesta inmunitaria humana frente a anticuerpo monoclonal Chi31.1-1 (HAMA)

Tiempo	ng/ml unido
0 hora (previo al tratamiento)	2
1 hora	3
2 horas	2
3 horas	3
4 horas	3
5 horas	2
6 horas	3
Día siguiente	4
1 semana	3
2 semanas	5

8. EJEMPLO: ACTIVIDAD ADCC DE ANTICUERPO CHI 31.1 DE CHO

La siguiente sección describe experimentos que demuestran que el anticuerpo monoclonal Chi 31.1 de CHO tiene actividad biológica asociada con la destrucción de tumores. Específicamente, se demostró que el anticuerpo tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

- 5 Se usó un ensayo de liberación de ^{111}In de cuatro horas para medir la actividad de ADCC. Las células diana fueron la línea celular de tumor de colon SW1643 y la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1. Se usó UPC-10 como un anticuerpo de control. Se marcaron las células diana con 50 μCi de ^{111}In -oxiquinolona durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron células diana (1×10^4) en 50 μl a placas de 96 pocillos. Se sometieron a ensayo razones de células efectoras con respecto a células diana de 100:1, 50:1 y 25:1 en presencia de 31.1 de CHO (1 mg/pocillo). Se incubaron las placas durante cuatro horas a 37° en atmósfera humidificada que contenía CO_2 al 5%. Se recogió el sobrenadante para el recuento gamma con el uso de marcos de colector de células Skatron. Se llevaron a cabo experimentos por triplicado. Se calculó la lisis específica con el uso de la siguiente fórmula:

$$10 \quad \% \text{ de lisis} = 100 \times \frac{\text{liberación observada (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación total (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}$$

15 Tal como se presenta en la figura 6A y 6B, el anticuerpo 31.1 de CHO, pero no el anticuerpo UPC-10 de control, pudo mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra las células diana.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal recombinante aislado que comprende dos componentes de cadena ligera y dos componentes de cadena pesada, en el que cada uno de dichos componentes de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 4 (SEQ ID NO: 6) y cada uno de dichos componentes de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada en la figura 2 (SEQ ID NO: 3), y en el que dicho anticuerpo presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) específica para células cancerosas de colon y de páncreas, siendo dicho anticuerpo monoclonal recombinante aislado para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas.
2. Kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está marcado.
4. Anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo recombinante tal como se describe en la reivindicación 1 unidas a secuencias de inmunoglobulina de región constante humana, siendo dicho anticuerpo quimérico para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas.
5. Kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo según la reivindicación 4.
6. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo está marcado.
7. Uso del anticuerpo según la reivindicación 1 ó 4 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas
8. Procedimiento de diagnóstico de cáncer de páncreas en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con el anticuerpo según la reivindicación 1 ó 4 en condiciones tales que puede producirse una reacción antígeno-anticuerpo inmuno-específica, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica mediante el anticuerpo.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo está marcado.